



Langtidsbelastning af miljørealistiske koncentrationer af pesticider på bundsamfund i ferskvand

stofomsætning, vækst, dødelighed og samfundsstruktur hos planter og dyr - et mikrokosmosstudium

Jacobsen, Dean; Sand-Jensen, Kaj

Publication date:
2015

Document version
Også kaldet Forlagets PDF

Citation for published version (APA):

Jacobsen, D., & Sand-Jensen, K. (2015). *Langtidsbelastning af miljørealistiske koncentrationer af pesticider på bundsamfund i ferskvand: stofomsætning, vækst, dødelighed og samfundsstruktur hos planter og dyr - et mikrokosmosstudium*. Miljøstyrelsen. Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen Nr. 158 <http://www2.mst.dk/Udgiv/publikationer/2015/07/978-87-93178-99-1.pdf>



Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

Langtidsbelastning af miljørealistiske koncentrationer af pesticider på bundsamfund i ferskvand

Stofomsætning, vækst, dødelighed og
samfundsstruktur hos planter og dyr - et
mikrokosmosstudium

Bekæmpelsesmiddelforskning nr. 158, 2015

Titel:

Langtidsbelastning af miljørealistiske
koncentrationer af pesticider på bundsamfund i
ferskvand

Forfatter:

Dean Jacobsen, Biologisk Institut, Københavns Universitet
Kaj Sand-Jensen, Biologisk Institut, Københavns Universitet

Udgiver:

Miljøstyrelsen
Strandgade 29
1401 København K
www.mst.dk

År:

2015

ISBN nr.

978-87-93178-99-1

Ansvarsfraskrivelse:

Miljøstyrelsen vil, når lejlighed gives, offentliggøre rapporter og indlæg vedrørende forsknings- og udviklingsprojekter inden for miljøsektoren, finansieret af Miljøstyrelsens undersøgelsesbevilling. Det skal bemærkes, at en sådan offentliggørelse ikke nødvendigvis betyder, at det pågældende indlæg giver udtryk for Miljøstyrelsens synspunkter. Offentliggørelsen betyder imidlertid, at Miljøstyrelsen finder, at indholdet udgør et væsentligt indlæg i debatten omkring den danske miljøpolitik.

Må citeres med kildeangivelse.

Indhold

Forord	5
Sammenfatning	7
Summary	9
1. Indledning	11
1.1 Baggrund og nuværende vidensgrundlag	11
1.2 Overordnet formål	14
2. Metoder	15
2.1 Projektets overordnede struktur	15
2.2 Pesticider, behandlinger og analyser	15
2.3 Statistisk analyse	17
2.4 Grundskudsplanter og smådyr fra sø (del 1)	17
2.5 Amfibiske planter fra vandløb (del 2)	23
2.6 Planter og dyr i hydroponisk kultur (del 3)	24
2.7 Interaktion: næring og pesticider (del 4)	27
3. Resultater	30
3.1 Grundskudsplanter og smådyr fra sø (del 1)	30
3.1.1 Pesticidkoncentrationer	30
3.1.2 Algevækst, nedbrydning af blad detritus og faunamortalitet	31
3.1.3 Ammonium, ferro-jern og uorganisk kulstof i sediment	32
3.1.4 Iltforbrug og produktion i kamre	32
3.1.5 Fotosyntese hos tvepibet lobelie	34
3.1.6 Morfologiske parametre og mortalitet hos tvepibet lobelie	34
3.1.7 Svampevækst i sediment	34
3.1.8 Eksperiment i petriskåle (supplement)	35
3.2 Amfibiske planter fra vandløb (del 2)	36
3.2.1 Pesticidkoncentrationer	36
3.2.2 Algevækst og nedbrydning af bladdetritus	38
3.2.3 Ammonium, ferro-jern og uorganisk kulstof i sediment	38
3.2.4 Iltforbrug og produktion i kamre	38
3.2.5 Morfologiske parametre og mortalitet hos planterne	39
3.3 Planter og dyr i hydroponisk kultur (del 3)	41
3.3.1 Pesticidkoncentrationer	41
3.3.2 Algevækst, nedbrydning af blad detritus og faunamortalitet	41
3.3.3 Morfologiske parametre og mortalitet hos planterne	42
3.4 Interaktion: næring og pesticider (del 4)	44
3.4.1 Pesticidkoncentrationer	44
3.4.2 Næringssaltkoncentrationer og vandkemi	45
3.4.3 Algevækst på kakler	45
3.4.4 Morfologiske parametre og mortalitet hos planterne	46
4. Diskussion	49
4.1 Grundskudsplanter og smådyr fra sø (del 1)	49

4.2	Amfibiske planter fra vandløb (del 2)	50
4.3	Planter og dyr i hydroponisk kultur (del 3)	50
4.4	Interaktion: næring og pesticider (del 4).....	51
4.5	Overordnet vurdering af de anvendte pesticiders effekter.....	52
4.6	Tværgående vurdering af eksperimenter og resultater	54
5.	Konklusion.....	57
6.	Perspektivering.....	58
6.1	Forskning	58
6.2	Miljøforvaltning	59
Referencer	61

Forord

Dette projekt blev udført på Ferskvandsbiologisk Laboratorium, Biologisk Institut, Københavns Universitet i perioden fra oktober 2010 til december 2013. Projektets oprindelige titel var ”Kronisk pesticidbelastning fra grundvand og blandingseffekter: Konsekvenser for stofomsætning, vækst og samfundsstruktur af højt målsatte planter og dyr i væld, kilder og på søbredder”, og blev finansieret af midler fra Miljøstyrelsens Program for Bekæmpelsesmiddelforskning.

Projektet blev ledet af lektor Dean Jacobsen, og blev søgt og udført i samarbejde med professor Kaj Sand-Jensen.

Vi vil gerne takke følgende personer fra Ferskvandsbiologisk Laboratorium, som i varierende omfang har været involveret i forskellige praktiske dele af projektet:

Flemming Brunddam (mekaniker), Del 1 & 2
Simon Granath (laborantelev), Del 2
Katrine Juul Hammer (studentermehjælper), Del 2
Anne Hinke (studentermehjælper), Del 1
Julie Hirsch (MSc-studerende), Del 1 & Suppl 1
Anne Jacobsen (laborant), Del 2
Birgit Kjølner (laborant), Del 1 & 2
Søren Kock Laursen (BSc-studerende), Del 1
Ayoe Lüchau (laborant), Del 4
Claus Lindskov Møller (postdoc), Del 1
Kathrine Petersen (studentermehjælper), Del 2, 3 & 4
Nanna Granlie Vansteelant (studentermehjælper), Del 4
Nils Villumsen (laborant), Del 1 & 2

Projektet er under sit forløb blevet understøttet af en følgegruppe med følgende deltagere (ud over Dean Jacobsen): Jørn Kirkegaard (Miljøstyrelsen, fmd.), Anne Louise Gimsing (Miljøstyrelsen), Peter Jørgensen (PJ-Bluetech), Specialkonsulent Marian Damsgaard Thorsted (Videncentret for Landbrug), Professor Hans Christian Bruun Hansen (Institut for Plante- og Miljøvidenskab, Københavns Universitet), Professor Poul Løgstrup Bjerg (Institut for Vand og Miljøteknologi, Danmarks Tekniske Universitet), Seniorrådgiver Peter Wiberg-Larsen (Institut for Bioscience, Aarhus Universitet), Lektor Bjarne W. Strobel (Institut for Plante- og Miljøvidenskab, Københavns Universitet), Adj. Professor Merete Styczen (Institut for Plante- og Miljøvidenskab, Københavns Universitet), Afdelingsleder Niels Lindemark (Dansk Planteværn), Seniorrådgiver Walter Brüsck (GEUS), Lektor Carsten Tilbæk Petersen (Institut for Plante- og Miljøvidenskab, Københavns Universitet), Seniorforsker Vibeke Ernstsén (GEUS), Forskningsleder Nikolai Friberg (Seksjon for Ferskvannsbibliologi, NIVA, Norsk Institutt for Vannforskning), Professor Jes Vollertsen (Institut for Byggeri og Anlæg, Aalborg Universitet), Professor Jens Aamand (GEUS)

Rapporten er blevet underkastet et fagligt peer-review af Merete Styczen, Morten Lauge Pedersen, Peter Wiberg-Larsen, Niels Lindemark, Hans Chr. Bruun Hansen, Nikolai Friberg og Anne Louise Gimsing.

Sammenfatning

Formålet med dette forskningsprojekt var at opnå viden om mulige fysiologiske og økologiske effekter på planter, alger, mykorrhizasvampe, smådyr og stofomsætning i bundsamfund i ferskvande udsat for langvarig eksponering til pesticider, men i lave koncentrationer. Dette kan tænkes at finde sted i kildevandsbaserede systemer i et scenarium med kontaminering af det øvre grundvand.

Projektet bestod af fire eksperimentelle mikrokosmosstudier udført i laboratorium. Langtidseffekten af forskellige kombinationer af herbicidet bentazon, fungicidet propiconazol og insekticidet pirimicarb i ”grundvandsrealistiske” ($0,05 \mu\text{g L}^{-1}$) såvel som høje ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) koncentrationer undersøgte på en lang række økologiske processer og fysiologiske parametre hos fire forskellige udvalgte plantesamfund: langsomt voksende grundskudsplanter i naturlige, uforstyrrede sedimentkerner og smådyr fra næringsfattige søer (delprojekt 1), samplantede amfibiske planter (vandmynte, tykbladet ærenpris og vandstjerne) fra vandløb (delprojekt 2), en kombination af ovennævnte plantegrupper i hydroponisk kultur, dvs. uden sediment (delprojekt 3) og en kombination af samplantede grundskuds-, vandskuds- og amfibiske planter ved forskellig næringsstilførsel og med og uden pesticideksponering (delprojekt 4).

Delprojekt 1 og 2 blev udført i særligt konstruerede kamre med konstant langsom indpumpning af vand med den ønskede pesticidbehandling fra under sedimentet og afdrening foroven, mens delprojekt 3 og 4 blev foretaget i plasticspande med stillestående vand med regelmæssig manuel vandudskiftning. Relativt store forsøgskamre ($\varnothing = 20 - 24 \text{ cm}$), benyttelse af naturligt sediment, fortsat vandudskiftning og den lange forsøgstid (4-6 måneder) var optimale for at opnå en økologisk relevant vurdering af de tilsatte stoffer. Hvor planterne blev omplantet (del 2 og 4), anvendte vi en lang akklimatiseringsperiode inden forsøget begyndte med pesticidtilsætning.

Vi undersøgte mange responssparametre for såvel overlevelse, morfologi og aktivitet hos planter, dyr, svampe og samlede mikrobielle samfund. Vi har således inddraget flere og økologiske relevante parametre i studiet, både på organisme- og på systemniveau, hvoraf mange aldrig før har været benyttet til at vurdere mulige pesticideffekter. Analysen dækker både forventet meget følsomme parametre som planters fotosynteseaktivitet, fotosyntesekapacitet og rodudskillelse af ilt og mindre følsomme parametre på kort sigt såsom overlevelse og størrelse og vægt af blade og rødder. Sidstnævnte parametre bør dog også reagere i tilfælde af negative effekter over den lange forsøgstid, vi har anvendt med gentagne målinger.

Vores resultater viser samstemmende, at der med få undtagelser ikke var signifikante effekter af de anvendte pesticider ved de formodet miljørelevante koncentrationer på de mange forskellige målte responseparametre, som dækkede både fysiologiske og økologiske niveauer.

Der blev fundet en betydelig variation i flere af de målte parametre. Det gør det generelt vanskeligt at vurdere kombinationseffekter af de tre undersøgte stoffer, fordi antal replikater i del 1 og 2 var lavt ($n = 3$). For enkeltstoffer var der imidlertid mange replikater ($n = 12$), og det samme gælder for kontroller ($n = 21$), så her ville en eventuel effekt af stofferne blive afsløret i analysen. Vores forsøg med tilsætning af næringsstoffer vidner om, at vores målesystem og anvendte parametre var i stand til at opfange respons på tilførte stoffer (del 4). Her reagerede systemet ganske kraftigt. Variation i tilgængelighed af næringsstoffer giver derfor anledning til markant større forandringer end de ikke målbare effekter ved tilsætning af pesticiderne.

Vi fandt ingen målbare ændringer hos de undersøgte arter, processer og økosystemer under langvarig indflydelse af miljørelevante koncentrationer af bentazon, propiconazol og pirimicarb. Denne konklusion kan selvfølgelig ikke udstrækkes til højere koncentrationer, til andre stoffer, eller til kombinationer med andre stoffer. Men vi finder altså på dette konkrete grundlag ikke anledning til at nære bekymringer for skadelige effekter af disse tre stoffer på de undersøgte arter og økosystemer, som vi før studiet anså for at være blandt de mest følsomme for langvaring ("kronisk") pesticidpåvirkning.

Summary

The objective of this research project was to gain insight on physiological and ecological effects on plants, algae, mycorrhiza-fungi, macroinvertebrates and decomposition of organic matter in benthic communities in freshwaters under long-term exposure to pesticides, as could take place in groundwater-based systems in a scenario of contamination of the upper groundwater.

The project consisted of four experimental microcosmos-studies carried out in the laboratory. Long-term effects of different combinations of the herbicide bentazone, the fungicide propiconazole and the insecticide pirimicarb in "groundwater-realistic" ($0.05 \mu\text{g L}^{-1}$) as well as high ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) concentrations was studied for a number of ecological processes and physiological parameters in four selected plant communities: slow-growing roset plants (*Lobelia dormanna* and *Littorella uniflora*) in natural undisturbed sediment-cores together with macroinvertebrates, leaf detritus and algae from nutrient-poor lakes (part 1), established assemblages of amphibian and aquatic plants (*Mentha aquatica*, *Veronica beccabunga* and *Callitriche* sp.) from spring streams (part 2), a combination of the above plants kept in hydroponic culture (i.e. without sediment) (part 3), and a combination of planted assemblages of roset, aquatic and amphibian plants exposed to different nutrient levels, with or without pesticides (part 4).

Part 1 and 2 were carried out in especially designed chambers providing a constant and slow inflow of water with the desired pesticide treatment from beneath of the substratum, draining at the top. Part 3 and 4 were conducted in plastic buckets with stagnant water, but undergoing frequent manual replacement of the water. Relatively big experimental chambers ($\varnothing = 20 - 24 \text{ cm}$), the use of natural sediment, constant renewal of water, and long experimental periods (4 – 6 months), were optimal to achieve a relevant ecological evaluation of the effects of the applied pesticide treatments. Where the plants were replanted (part 2 and 4) we allowed for a long acclimatisation period prior to the initiation of the experiments with pesticide addition.

We measured many response parameters for survival, morphology and activity of plants, animals, fungi and microbial communities. We have thus included ecologically relevant parameters in the study, both at organism- and ecosystem level, many of which have not previously been studied in concert to evaluate possible effects from pesticides.

The analysis covers both presumably very sensitive parameters such as photosynthetic activity, photosynthetic capacity and excretion of oxygen from roots, as well as less sensitive parameters at a short-term scale such as survival, size and mass of leaves and roots. However, the latter should also respond negatively over the long experimental period with repeated measurements.

Our results demonstrate that, with very few exceptions, the applied environmentally realistic concentrations of the three pesticides did not produce systematically significant effects on any of the many physiological and ecological response parameters measured.

We found a considerable variability in several of the measured parameters. That makes it difficult to detect effects of specific combinations of the applied pesticides because the number of replicates in part 1 and 2 was low ($n = 3$). The number was higher for single pesticides ($n = 12$), as well as for controls ($n = 21$), so here we expect that an effect should certainly be statistically detectable. The clear effects in our experiment with addition of nutrients (part 4) demonstrate that our approach and chosen response parameters were appropriate. Variability in supply of nutrients therefore appears to produce larger changes than the non-detectable ones from the addition of pesticides.

We found no measurable changes in the studied species, processes and ecosystems under long-term exposure to environmentally realistic concentrations of bentazone, propiconazole and pirimicarb. This conclusion can of course not be extended to higher concentrations, to other substances, or to combinations with other substances. On the current basis, however, we are not concerned about harmful effects from these three pesticides on the studied species and ecosystems, which we initially regarded as belonging to the most sensitive towards long-term ("chronic") exposure to pesticides.

1. Indledning

1.1 Baggrund og nuværende vidensgrundlag

Nogle af de højest værdsatte økosystemer i Danmark og i EU's Habitatdirektiv (NATURA 2000 typer) er: 1) Kalk- og næringsfattige søer og vandhuller (Lobeliesøer) (habitattype 3110) og 2) vandløb med vandplanter (habitattype 3260). Førstnævnte er karakteriseret ved samfund af langsomt voksende grundskudsplanter (også benævnt rosetplanter eller isoetider), og sidstnævnte af en række både egentlige undervandsplanter og amfibiske planter. Disse samfund er enten direkte truet, eller i det mindste påvirket, af eutrofiering fra luften og af høje koncentrationer af kvælstof og fosfor i tilstrømmende overfladevand fra især landbrugsarealer (Jensen et al. 2013). Derudover har også det yngre, overfladenære grundvand (vandtype A) nitratkoncentrationer der fx overstiger grænseværdien for drikkevand (50 mg L^{-1}) i 30-40 % af vandforsyningsboringerne (Thorling et al. 2013). Høje koncentrationer af fosfor i grundvand er primært geologisk betinget, og forekommer typisk i dybere og i ældre grundvand, der ikke umiddelbart er økologisk relevant. Dog har ca. 20 % af de dybere vandværksboringer et total-fosfor koncentrationer $> 0,15 \text{ mg L}^{-1}$ (Thorling et al. 2013).

De naturlige plantesamfund er muligvis også påvirket og svækket af kortvarende pulse af pesticider der transporteres til det akvatiske miljø via luften (vinddrift), overfladeafstrømning og via drænen fra selv samme landbrugsområder (Styczen et al. 2003; Kronvang et al. 2004; Møhlenberg et al. 2004). Blandt de fundne pesticider er der flest herbicider og det er også herbiciderne, som måles i de højeste koncentrationer, mens målinger og fund af fungicider og insekticider er mere sparsomme. Herbicider har - i de højeste koncentrationer som er fundet under pulse i danske vandløb - formodentlig ingen akut skadevirkning på bundlevende alger og vandplanter (Cedergreen *et al.* 2004), ligesom påvirkning af makroinvertebrater er relativt usandsynlig (Wiberg-Larsen & Nørum 2009). Adskillige laboratorieundersøgelser af effekter af forskellige herbicider på diverse plantemorfologiske respons parametre ("endpoints") hos en række vandplanter viser, at der generelt kun ses effekter ved temmeligt høje koncentrationer på $> 5 \mu\text{g L}^{-1}$ (Forney & Davis 1981; Cedergreen et al. 2004; Belgers et al. 2007; Arts et al. 2008). En undtagelse er Huiyun et al. (2009), der testede effekten af 4 herbicider (butachlor, quinclorac, bensulfuron-methyl og atrazine) på 3 vandplanter (*Ceratophyllum demersum*, *Vallisneria spiralis* og *Elodea nuttallii*), og fandt signifikante effekter af alle stoffer helt ned til $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Imidlertid er effekten på plantevæksten afhængig af både koncentrationen og den tid, planten har været udsat for stoffet (Belgers et al. 2011), og samtlige ovenfor nævnte undersøgelser havde en varighed af eksponeringen over for stofferne på maksimalt 3 uger.

En relevant men delvist overset problematik ligger således muligvis i en længerevarende "kronisk", og dermed økologisk relevant, eksponering af organismerne over for pesticider. For akvatiske

systemer kan denne eksponering både ske via luften, overfladevandet og grundvandet. Især er mange værdifulde plantesamfund grundvandsbetingede. Det er tilfældet for samfund på bredden af næringsfattige søer uden overfladisk tilstrømning og samfund i grundvandsfødte vandløb (kildevandløb). Der blev i 2012 fundet et eller flere pesticider eller nedbrydningsprodukter heraf i 42 % af de undersøgte indtag i grundvandsovervågningen, og grænseværdien ($0,1 \mu\text{g L}^{-1}$) var overskredet i 12 % af indtagene (Thorling et al. 2013). Særligt BAM (nedbrydningsproduktet af Dichlorbenil og Chlorthiamid) findes i ca. 20 % af analyserne fra grundvandsovervågningen (Geus 2009). Fungicider og insekticider forekommer sjældent i grundvand, fordi de er mindre vandopløselige og kun anvendes om sommeren, hvor grundvandsdannelsen er beskeden, men de bruges i temmelig store mængder i Danmark, og kan tilføres de nævnte samfund via luften (vinddrift), overflade- og drænvand

Effekten af ”kronisk” pesticidbelastning er kun blevet testet i få tilfælde. Kroniske effekter på alger som følge af herbicider kan muligvis forekomme i landbrugspåvirkede vandløb under lav sommervandføring. Coutiris et al. (2011) undersøgte effekten af en blanding af 3 herbicider (50% atrazine, 35% isoproturon, 15% alachlor) på 6 arter af makrofyter plantet sammen i mikrokosmoseksperimenter over 8 uger. De fandt reduktion af den samlede biomasse og diversitet af samfundene ved en høj samlet koncentration på $60 \mu\text{g L}^{-1}$. I et andet langtidseksperiment over 84 dage udsatte man undervandsplanter (*Myriophyllum spicatum* og *Elodea canadensis*) og to emergente arter (dvs planter der vokser ud af vand) (*Persicaria amphibia* og *Glyceria maxima*) placeret i udendørs vandbeholdere for varierende koncentrationer af herbicidet simazine. Her fandt man at $50 \mu\text{g L}^{-1}$ påvirkede en række biologiske og fysiologiske parametre (Vervliet-Scheebaum et al. 2010). Vi har dog ikke kendskab til langtidstudier, der omfatter samlede økosystemfunktioner som stofproduktion og nedbrydning, plante- og dyrearters mortalitet og vækst samt fysiologisk stress. Fysiologisk stress er et tidligt og følsomt tegn på ugunstige betingelser, som med en vis forsinkelse forplanter sig i nedsat vækst, omsætning og ændret samfundsstruktur.

Grundskudsplanter på lavt vand i næringsfattige søer stiller gennemgående særligt store krav til uforurenet vand og tidlig stabilitet (Sand-Jensen et al. 2005). De er kun i stand til at udnytte CO_2 som uorganisk kulstofkilde, og den optager de med rødderne fra sedimentet. De vokser sædvanligvis meget langsomt og kan derfor forventes at være særligt følsomme for forøget direkte og indirekte stress fra pesticider, og for at kunne tabe i konkurrencen med mere robuste og hurtigtvoksende arter som fx amfibiske- og vandskudsplanter (Sand-Jensen & Borum 1991). De amfibiske planter vokser typisk ”ud af vandet”, og får på den måde langt bedre tilgang af uorganisk CO_2 fra luften til fotosyntesen (Sand-Jensen & Jacobsen 2002). Det har også den mulige konsekvens, at en mindre del af planten er eksponeret til opløst herbicid i vandet. Vandskudsplanterne (også kaldet rankeskudsplanter eller elodeider) opretholder typisk en hurtig vækst, fordi de er i stand til at udnytte vandets opløste bicarbonat (HCO_3) som uorganisk kulstofkilde og deres vækstform fremmer også lysudnyttelsen.

Et andet forhold kan forstærke grundskudsplanternes følsomhed for pesticider. Grundskudsplanter i næringsfattige søer som tvepibet lobelie (*Lobelia dortmanna*), strandbo (*Littorella uniflora*) og sortgrøn bransenfode (*Isoetes lacustris*) har et intimt samarbejde med arbuskulært mykorrhizasvampe (eller VA-mykorrhiza). Denne særlige form for endomykorrhiza danner arbuskler – dvs. forgrenede, fine hyfer, som er træformede, inden i rodcellerne. Dette sikrer en effektiv

nedbrydning af organisk stof i sedimentet og forsyner planten med næringsioner (især fosfat) fra et stort sedimentvolumen (Andersen & Andersen 2006, Møller & Sand-Jensen 2013). Andre planter har vist sig også at benytte sig af sådanne samarbejder. I fugtige væld med *Paludella*-mosser er orkideen Sump-Hullæbe (*Epipactis palustris*) totalt afhængig af svampesymbiose for overhovedet at få frøene til at spire og rodnettet til at vokse (Rasmussen 2002). Plantens blade leverer ved fotosyntesen organisk stof til konsortiet, mens svampen leverer de uorganiske næringsioner.

Grundskudsplanter er altså afhængige af en funktionsduelig symbiose med svampe, mens dette kun er kendt i begrænset omfang for amfibiske planter, og slet ikke hos vandskudsplanter (Beck-Nielsen & Madsen 2001). På trods af at arbuskulært mykorrhiza (svampegruppen der danner symbiose med fx *Lobelia*-rødder) har meget lavere koncentrationer af fedtsyren ergosterol i cellevæggene end andre svampegrupper, så er de mest almindelige ergosterol-hæmmende fungicider som fx propiconazol alligevel i stand til at påvirke mykorrhizaen (Kjøller & Rosendahl 2000). Derfor kan en cocktail af fungicider og herbicider vise sig at udgøre et særligt problem, dels fordi stress på enten svampen, planten eller på begge parter kan forstærke stress på konsortiets opførsel som helhed og dermed ramme de enkelte parter endnu hårdere. På den anden side har vandplanter også vist sig at være i stand til at afgifte fungicider (Dosnon-Olette et al. 2009).

I kildebække og på det lave vand i søer indgår smådyr (makroinvertebrater) som integrerede partnere sammen med planter, svampe og bakterier. Der er især to vigtige roller af makroinvertebrater for at holde planterne og økosystemet sundt, nemlig 1) via græsning af belægninger af mikroalger og bakterier på undervandsblade af vandplanter (epifyton) (som udføres af den fødefunktionelle gruppe benævnt "græssere" eller "skrabere"), og 2) som findelere og nedbrydere af dødt organisk stof som fx groft detritus (forestås af de såkaldte "iturivere") (Wallace & Webster 1996; Allan & Castillo 2007). Mange tidligere studier har påvist effekter af både pulse og mere konstante påvirkninger af både insekticider (særligt pyrethroider), herbicider og fungicider på ferskvandssmådyr i naturen (Muirhead-Thomsen 1987). Påvirkningen sker ikke blot på adfærd (Nørum & Bjerregaard 2003), mortalitet og samfundstruktur (Liess & Von der Ohe 2005), men også på makroinvertebraternes funktionalitet i forbindelse med de ovenfor nævnte økologiske nøgleprocesser (Lauridsen et al. 2006; Rasmussen et al. 2008; Wiberg-Larsen & Nørum 2009).

For langsomt voksende grundskudsplanter og mosser med en bladlevetid på et år eller mere er det af afgørende betydning, at det mikrobielle samfund hele tiden græsses og renses af, således at lystilgangen til bladet sikres, og der endvidere ikke sker patologiske angreb af svampe og bakterier fra overfladefilmen og ind i bladet (Ramsay & Fry 1976, Rogers & Breen 1982). Begge trusler forstærkes af eutrofiering, der øger biomassen af epifytiske algebelægninger, og af insekticider, der måtte dræbe eller hæmme græssere som eksempelvis snegle og visse døgnfluer, der ellers holder denne algebelægning nede. Resultatet er, at den mikrobielle biofilm hober sig op (Feminella & Hawkins 1995; Wallace & Webster 1996; Vinebrooke et al. 2003). Omvendt er det velkendt, at visse herbicider kan hæmme væksten af algebelægninger i ferskvand (Kosinski 1984; Gustavson et al. 2003; Debenest et al. 2009).

Hvis de makroinvertebrater, der normalt står for findelingen af det grove organiske stof, forsvinder, kan der akkumuleres organisk stof, som med tiden fører til uegnede vækstbetingelser for planterne. Især grundskudsplanter er følsomme, fordi den mineralske, veliltede bund, som er en forudsætning

for deres vækst og overlevelse, forsvinder (Sand-Jensen et al. 2005, Møller & Sand-Jensen 2012). Sker det ved kronisk pesticidbelastning, kan det føre til ophobning af grovkornet organisk stof, udvikling af en løs bund med dårligt rodfæste og til reduktion af den samlede mikrobielle nedbrydning. Makroinvertebraternes nedbrydning af det grove organiske stof (detritus) afhænger i høj grad af en forudgående kolonisering af svampe og bakterier (særligt svampegruppen hyfomyceter) (Gessner & Chauvet 1994; Graca & Canhoto 2006), og fungiciders hæmning af denne koloniseringsprocess kan yderligere nedsætte omsætningen af detritus (Rasmussen et al. 2012).

Studier har vist at effekten af pesticidblandinger, den såkaldte ”cocktail-effekt”, kan være svær at forudse (Munkegaard et al. 2008; Relyea 2009; Verbruggen & Van den Brink 2010), og der kan være tale om både synergistiske og antagonistiske effekter mellem alle tre pesticidgrupper. Eksempelvis har visse fungicider vist sig at hæmme nedbrydningen af herbicider og forstærke midlernes giftighed med i hvert fald 10 gange (Nørgaard & Cedergreen 2009).

1.2 Overordnet formål

Formålet med dette forskningsprojekt var at opnå viden om langsigtede fysiologiske og økologiske effekter af pesticider på planter, alger, mykorrhizasvampe, smådyr og stofomsætning i samfund af grundskudsplanter fra næringsfattige søer, og amfibiske planter og vandskudsplanter fra kildebække og næringsrige systemer. Vi ønsker specifikt at adressere følgende overordnede hypoteser:

- Højt værdsatte plantearter med langsom vækst bliver kraftigere påvirkede i deres fysiologi, vækst og overlevelse af pesticider end almindelige arter med hurtig vækst.
- Herbicider, fungicider og insekticider i kombination og efter lange påvirkningstider udløser et særligt stort stress.
- Plantearter med veludviklet svampemykorrhiza, tilknyttet næringsfattige miljøer, er særligt følsomme for pesticider pga. partnernes gensidige afhængighed og de dobbelte muligheder for påvirkning.
- Pesticider kan påvirke den samlede omsætning i sedimentet, og fremkalde dårligere forhold for rødderne ved forøget iltvind og ophobning af fytotoxiner (fx ferrojern, ammonium).
- Pesticider interagerer med næringssaltniveauer i at påvirke udkommet af konkurrenceforholdet mellem langsomt voksende grundskudsplanter og hurtigt voksende vandskudsplanter.
- Nedbrydning af groft detritus samt opbygning af algebiomasse påvirkes af pesticider, enten direkte eller indirekte via effekt på ituvivere og græssere blandt smådyrene.

Disse overordnede spørgsmål besvares fra forskellig vinkel på baggrund af 4 del-eksperimenter, der hver har deres egne specifikke formål, der gennemgås i det følgende.

2. Metoder

2.1 Projektets overordnede struktur

Projektet består af fire eksperimentelle mikrokosmosstudier udført i laboratorium. Langtidseffekten af forskellige kombinationer af herbicidet Bentazon, fungicidet Propiconazol og insekticidet Pirimicarb i "grundvandsrealistiske" koncentrationer undersøges på en lang række økologiske processer og fysiologiske parametre hos fire forskellige udvalg af planter ("plantesamfund"): smådyr og langsomtvoksende grundskudsplanter fra næringsfattige søer (delprojekt 1), samfund af amfibiske planter (vandmynte, tykbladet ærenpris og vandstjerne) fra vandløb (delprojekt 2), en kombination af ovennævnte plantegrupper i hydroponisk kultur, dvs. uden sediment (delprojekt 3) og en kombination af grundskuds-, vandskuds- og amfibiske planter ved forskellig næringstilførsel (delprojekt 4). Sedimenter, planter og dyr der blev anvendt i systemerne blev af praktiske årsager i nogen grad hentet fra forskellige lokaliteter. Det varierede også mellem de enkelte projektdele, i konsekvens af at forskellige økosystemtyper/habitater skulle dækkes af projektet.

2.2 Pesticider, behandlinger og analyser

De tre forskellige pesticider bentazon, propiconazol og pirimicarb blev valgt ud fra flere kriterier: 1) de repræsenterer hver af grupperne herbicider, fungicider og insekticider, 2) de er tilladte og bliver anvendt i Danmark (Miljøstyrelsen), 3) de har moderat til høj vandopløselighed og mobilitet, 4) de er med i Varslingssystemet for udvaskning af pesticider til grundvandet (VAP) og 5) de kan alle analyseres med samme metode, hvilket nedbringer omkostninger til analyser.

I alle deleksperimenter arbejdes med én eller flere af de tre nominelle koncentrationer: 1) nul (kontrol), 2) $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$, svarende til størrelsesordenen for niveauer målt eller modelleret i grundvand og overfladevand og 3) $5 \mu\text{g L}^{-1}$ svarende til ca. 100 gange forhøjede niveauer. Stoffernes effekt undersøges individuelt samt i kombination for at påvise eventuelle blandingseffekter ("cocktaileffekt"). Det vides dog pt ikke om disse tre pesticider, via deres "modes of action", kan forventes at vekselvirke. Stofferne er så vidt vides heller ikke fundet sammen i grundvand, og kan ikke forventes at forekomme i gammelt grundvand. De høje koncentrationer, særligt i samspil, repræsenterer således et "worst case scenario".

De nedenfor angivne kemiske egenskaber for de anvendte pesticider er hentet gennem FOOTPRINT portalen (<http://www.eu-footprint.org/ppdb.html>).

Bentazon: Dette herbicid virker ved at blokere elektrontransporten i fotosyntese system II, og optages både over rødder og blade. Opløseligheden i vand er relativt høj (570 mg L^{-1}), og

adsorptionen til jord er relativt lav: $K_d = 0,72$ ("mobile") og $K_{foc} = 86 \text{ mL g}^{-1}$ ("moderately mobile"). Halveringstiden (DT_{50}) er 45 dage ved 20 °C i laboratoriet ("moderately persistent") og 14 dage i felten ("non-persistent"). Fotolysen er derimod kun 4 dage ("moderately fast") (<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/71.htm>). Avendelsen (hovedsagligt på korn og græs) er reguleret af hensyn til grundvandet, da stoffet udvaskes reletivt let, og salget i Danmark er dalet siden det toppede i midt-90'erne (Miljøstyrelsen 2013). Stoffet analyseres i grundvandsovervågningen (GRUMO), hvor den gennemsnitlige koncentration ligger ret konstant på $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ (grænseværdien). Det er påvist i 6 % af grundvandsovervågningen (Geus 2009). Der er foretaget i alt 12 undersøgelser på bentazon i VAP (Varslingssystem for udvaskning af pesticider til grundvand) hvoraf der i to undersøgelser har været enkelte overskridelser af grænseværdien i helt ungt grundvand. I VAP er det fundet i max koncentrationer på $0,012 - 43 \mu\text{g L}^{-1}$, og stoffet vurderes at have høj udvaskningsrisiko, idet det blev fundet i gennemsnitskoncentrationer $> 0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ i 1 meters dybde efter første anvendelsessæson (Brüsch et al. 2013). I en undersøgelse af ti udvalgte jyske ådale blev bentazon fundet i prøver fra vandløb (11 %), det øvre grundvand (3 %), jordvand (1 %), drænvand (70 %) og regnvand (2 %), i maksimumskoncentrationer på mellem $0,013$ og $0,022 \mu\text{g L}^{-1}$ (Ejrnæs et al. 2014). Bentazon indgår desuden i NOVANA overvågningsprogrammet for vandløb (Naturstyrelsen 2011).

Propiconazol: Dette fungicid virker ved at inhibere ergosterolsyntesen, og er som andre stoffer fra azol gruppen hormonforstyrende. Opløseligheden i vand er moderat (150 mg L^{-1}), og adsorptionen til jord høj: $K_d = 33,7$ ("slightly mobile") og $K_{foc} = 2252 \text{ mL g}^{-1}$ ("slightly mobile"). Halveringstiden (DT_{50}) er 90 dage ved 20 °C i laboratoriet ("moderately persistent") og 214 dage i felten ("persistent"). Der er ingen væsently fotolyse (<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/551.htm>). Propiconazol er almindeligt anvendt, særligt om sommeren på kornafgrøder, og fungicider fra azol-gruppen er sporadisk påvist i grundvand, men stoffet indgår som sådan ikke i grundvandsovervågningen (GRUMO), ej heller i NOVANA overvågningen. I VAP er den højest fundne koncentration på $0,86 \mu\text{g L}^{-1}$, og stoffet vurderes at have middel udvaskningsrisiko idet det blev fundet i gennemsnitskoncentrationer $< 0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ i 1 meters dybde efter første anvendelsessæson (Brüsch et al. 2013).

Pirimicarb: Er et insekticid tilhørende carbamat-gruppen. Det virker ved at blokere for transmission af nerveimpulser ved at inhibere enzymet acetyl cholin esterase (AChE). Opløseligheden i vand er meget høj (3100 mg L^{-1}), og adsorptionen til jord relativt lav $K_{foc} = 388 \text{ mL g}^{-1}$ ("moderately mobile"). Halveringstiden (DT_{50}) er 86 dage ved 20 °C i laboratoriet ("moderately persistent") og 9 dage i felten ("non-persistent"). Fotolysen er derimod kun 6 dage ("moderately fast") (<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/530.htm>). Stoffet anvendes primært til bekæmpelse af bladlus i visse afgrøder i landbrug, gartneri, frugtavl og planteskoler. Stoffet indgår hverken i grundvandsovervågningen (GRUMO) eller vandløbsovervågningen (NOVANA). Den højest målte koncentration i VAP har været på $0,077 \mu\text{g L}^{-1}$, og stoffet vurderes at have høj udvaskningsrisiko idet det blev fundet i gennemsnitskoncentrationer $> 0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ i 1 meters dybde efter første anvendelsessæson (Brüsch et al. 2013).

Bentazon formuleringen "LFS Bentazon" (PR-nummer: 318-36) (konc. 480 g L^{-1}) og Pirimicarb formuleringen "LFS Pirimicarb" (PR-nummer: 318-81) (konc. 500 g kg^{-1}) blev indkøbt hos LFS-

Kemi ApS (Esbjerg). Propiconazol formuleringen "Bumper 25 EC" (konc. 250 g L⁻¹) fra Makhteshim-Agan Benelux & Nordic BV blev indkøbt hos AAKO Danmark ApS (Hillerød).

Stamopløsninger af bentazon (1 mL produkt opløst i 1,92 L demineraliseret vand = 250 mg L⁻¹), propiconazol (1 mL produkt opløst i 1,00 L lunkent demineraliseret vand = 250 mg L⁻¹) og pirimicarb (1 g produkt opløst i 2,00 L demineraliseret vand = 250 mg L⁻¹) blev fremstillet og opbevaret i glasflasker på køl. De tre stamopløsninger blev efterfølgende fortyndet éns inden tilsætning til eksperimenterne. For den lave behandlingskoncentration (0,05 µg L⁻¹) fortyndedes først 1 mL af stamopløsningen til 1,00 L vand (= 250 µg L⁻¹) og dernæst 2 mL af denne til 10 L vand (0,05 µg L⁻¹). For den høje behandlingskoncentration (5,0 µg L⁻¹) fortyndedes først 20 mL af stamopløsningen til 1,00 L vand (= 5,0 mg L⁻¹) og dernæst 10 mL af denne til 10 L vand (5,0 µg L⁻¹).

Undervejs i eksperimenterne blev de nominelle koncentrationer verificeret ved at udtage prøver af indløbs- og udløbsvand. De udtagne vandprøver blev analyseret af firmaet Eurofins efter metode M8212B. Indenfor en uge efter prøverne var modtaget af Eurofins blev prøverne opkoncentreret ved fastfaseekstraktion på SPE-kolonner (strataX eller tilsvarende). Prøverne blev opkoncentreret uden forudgående filtrering, men med tilsætning af intern standardopløsning og pH justering til 4,5 ved tilsætning af buffer. Efter opkoncentrering blev prøverne (SPE-kolonnerne) opbevaret på frost, indtil prøverne blev elueret ud fra SPE-kolonnerne med methanol/acetonitril. Ekstraktet blev tilsat 1,2-propandiol som keeper, inddampedes til tørhed og blev genopløst i 5 % methanol inden analyse på LC-MS/MS.

2.3 Statistisk analyse

Effekt af pesticidbehandlinger på respons-parametrene (logaritmetransformerede for at tilnærme normalitet) testes i de fleste tilfælde med envejs ANOVA. I deleksperiment 4 hvor interaktionen mellem næringssaltniveau og pesticidbehandlinger undersøges anvendes en to-vejs ANOVA. Hvor kamre sammenlignes over tid anvendes t-test for parrede observationer. Hvor det ikke var muligt at opnå normalfordeling ved transformation blev der brugt Kruskal-Wallis test, når der var tale om mere end to observationssæt, og Mann-Whitney U-test når der var tale om to observationssæt.

I del 3 sammenlignes efterfølgende de 9 behandlinger (med hver 10 replikater) med Tukey's parvise test. Dette gøres ikke i del 1 og 2, hvor der er 15 forskellige behandlinger (med hver 3 replikater). I stedet testes effekten af koncentration (kontrol, lav og høj) indenfor hvert af de 3 pesticider særskilt (med varierende koncentration af de to andre pesticider for at øge antallet af replikater), med en ny ANOVA. I alle tilfælde blev der som udgangspunkt anvendt et signifikansniveau på $\alpha = 0,05$. Ved de tre gentagne tests af koncentrationseffekten af hver enkelt pesticid for sig foretoges dog Bonferroni-korrektion af signifikansniveauet ($\alpha = 0,05/3 = 0,017$).

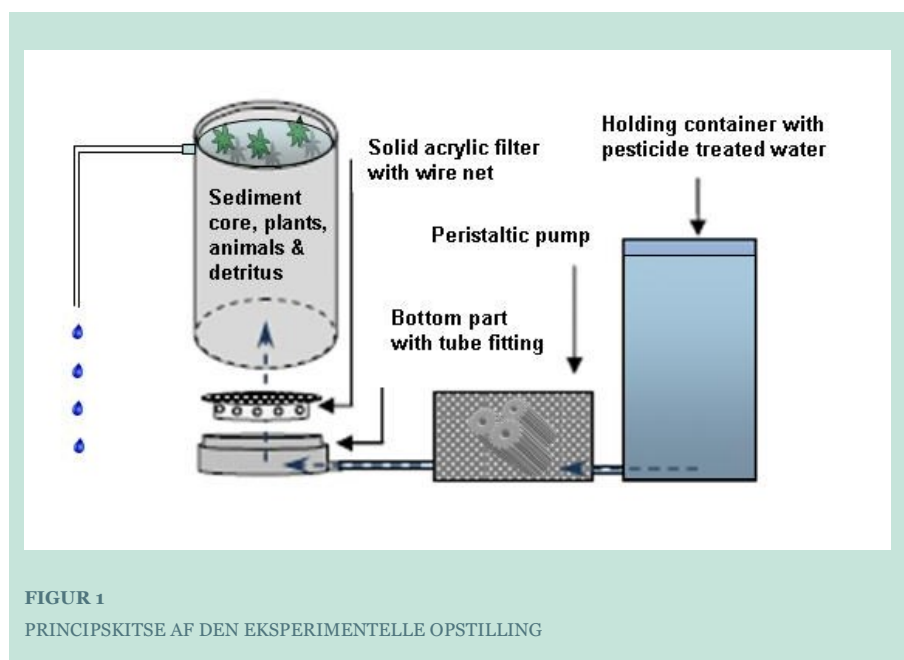
2.4 Grundskudsplanter og smådyr fra sø (del 1)

Formålet med dette deleksperiment var at undersøge cocktaileffekter af langtidseksposering af grundvandsrealistiske koncentrationer af pesticider på vækst og stofomsætning i samfund af

grundskudsplanter og fauna i naturlige sedimentkerner fra en næringsfattig sø. Disse samfund forventes at være meget følsomme over for både herbicider og fungicider fordi disse undervandsplanter vokser langsomt og er afhængige af rod-symbiose med mykorrhiza-svampe.

Ekspirimenterne blev udført på Ferskvandsbiologisk Laboratorium i Hillerød, i kølerum ved 14 °C og med en 12 timers lys:12 timers mørke-cyklus. De eksperimentelle mikrokosmoskamre blev placeret ca. 40 cm under 8 lysstofrør (54 W, 10000 K) indsat i fatning, der reflekterede lyset. Der blev opsat reflekterende papir på væggene rundt om forsøgsopstillingen for at undgå forskel i lystilgang til de forskellige kamre.

Der etableredes samfund af planter, detritus og smådyr i cirkulære kamre (Ø 20 cm). To 24 kanals slangepumper af mærket Baoding Longer Precision Pump Co. Ltd. leverede ca. 0,5 ml min⁻¹ til hvert kammer (= 1 L m⁻² time⁻¹), som svarer til den grundvandsindsivning, vi kender fra naturen (Schou-Frandsen 2009). Reservoiret med pesticidblandingen bestod af en 10 L plasticdunk, som initielt var fyldt, hvilket giver en opholdstid for pesticidvandet i dunkene på max 14 dage. Idet vandvolumet i kamrene var ca. 4,0 L i del 1 og ca. 5,5 L i del 2 svarer dette til en opholdstid for vandet med pesticiderne på henholdsvis 5,5 og 7,5 dage. Vandet (med eller uden pesticid, afhængig af behandling), perkolerede ind gennem sedimentlaget i bunden af kamrene, og forlod kamrene foroven gennem en udløbsstuds. Disse mikrokosmoseksperimenter varede i 4 - 6 måneder for at efterligne påvirkningens kroniske karakter og matche, for nogle af planternes vedkommende, deres langsomme vækst og omsætning i naturen. Se Figur 1 for en skematisk plan af opstillingen.



Hvert samfund i laboratorieeksperimenterne blev udsat for hver koncentration af pesticid i 4 behandlinger med varierende tilstedeværelse af andre pesticider (se Tabel 1). Da hver pesticidkombination blev udført i 3 replikater, blev hver koncentration af et givet pesticid anvendt 12 gange, mens der var 7 behandlinger helt uden et givet pesticid (6 af disse dog med tilstedeværelse af andre pesticider). Dette giver som referencer for hvert pesticid i alt 7 x 3 replikater = 21 prøver. I alt anvendtes 45 enkeltkamre per samfund (3 replikater x 15 behandlinger).

TABEL 1

DOSERINGSSKEMA FOR 15 BEHANDLINGER AF DE TRE PESTICIDER. o = INTET (KONTROL),
L = LAV (0,05 µG L⁻¹), H = HØJ (5 µG L⁻¹).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
Bentazon (Herbicid)	o	L	o	o	H	o	o	L	o	L	L	H	o	H	H
Propiconazol Fungicid)	o	o	L	o	o	H	o	L	L	o	L	H	H	o	H
Pirimicarb (Insekticid)	o	o	o	L	o	o	H	o	L	L	L	o	H	H	H

Naturlige, uforstyrrede relativt tætte sedimentkerner, primært bestående af fint sand med naturligt indhold af organisk stof på 1 – 2 % tørvægt, blev den 26. okt. 2010 hentet i Skånes Vårsjö (Sverige), placeret direkte i de til formålet producerede PVC cylindre (kamrene). Sedimentkernerne var 15-20 cm dybe, med gennemsnitligt $16,9 \pm 4,4SD$ (8-26) planter af tvepibet lobelie (*Lobelia dortmanna*) i hver, samt mindre tætheder af de to andre grundskudsplanter strandbo (*Littorella uniflora*) og liden siv (*Juncus bulbosus*). Denne variation i antallet af planter per kammer var uundgåelig, idet der var tale om naturlige sedimentkerner, men kamrene blev tilfældigt fordelt mellem behandlinger. Variationen i antallet af planter kan potentielt påvirke responseparametre på kammerniveau, men næppe de plantemorfologiske parametre, der udtrykkes per individ. Til gennempumpning af kamre anvendtes vand fra Esrum sø fortyndet 5 gange med demineraliseret vand. Vanddybden i kamrene var 5-8 cm. Den færdige opstilling ses på Billede 1.

Til hvert kammer blev der tilført én flodnerit snegl (*Theodoxus fluviatilis*) hentet i Esrum sø den 14. dec., to ferskvandstanglopper (*Gammarus pulex*) og én vandbænkebidder (*Asellus aquaticus*), begge hentet i Pøle å den 27. dec. Den anvendte snegl er udbredt i større danske søer, vandløb og brakvand. Den lever primært som græsser på sten, hvor den rasper biofilm af alger, bakterier og svampe. De to krebsdyr er også meget almindelige og talrige i danske søer og vandløb, hvor de primært lever som iturivere af groft detritus. Disse arter blev valgt til at indgå i eksperimentet fordi de var tilgængelige da opstillingen skulle etableres, og de blev tilført i tætheder, der var håndterlige og i nærheden af de naturlige.



BILLEDE 1

OPSTILLING AF MIKROKOSMOSKAMRENE I KØLERUM UNDER DEL 1.

Til hvert kammer blev der tilført to små hvide keramiske kakler ($2,3 \times 2,3 \times 0,4$ cm), til bestemmelse af algevækst. Efter 43 dage (periode 1) blev der taget én kakkel op fra hvert kammer, lagt i et kendt volumen 96 % ethanol i ca. 4 døgn i køleskab, og klorofyl-a blev derefter målt spektrofotometrisk. Disse kakler blev derefter lagt tilbage i kamrene og blev bevokset igen, nu 135 dage (periode 2), til afslutning af forsøget. Den anden halvdel af kaklerne lå i mikrokosmoskamrene under hele forsøget (periode 3). Kakler fra periode 2 og 3 blev klorofylekstraheret på samme måde som efter periode 1.

Bøgeblade (*Fagus sylvatica*) med nogenlunde samme grad af nedbrydning blev indsamlet i Fønstrup bæk, (tilløb til Esrum sø). Bladskiver (180 stk) med en diameter på 29 mm, blev udstukket af bladene, tørret over 24 timer og vejte i bundter af tre, og disse tre bladskiver blev derpå anbragt i en lille netpose (samlet vægt per pose på $0,1021 \text{ g TV} \pm 0,0177 \text{ SD}$). Fire små nylonnetposer (4×4 cm), to med $200 \mu\text{m}$ maskevidde (kun adgang for mikroorganismer), og to med $0,5 \text{ cm}$ maskevidde (adgang for mikrober og iturvivende smådyr) blev lagt i hvert kammer. De finmaskede poser blev syet på maskine og de grovmaskede blev limet sammen med ikke toksisk akvarie-silikone. Poserne blev lagt i hvert forsøgskammer i tilfældig rækkefølge og tynget ned med småsten fra Esrum sø for at undgå, at de flød til overfladen. Poserne blev anbragt således at de skyggede mindst muligt for planterne. Bladposerne blev lagt i forsøgskamrene den 27. dec. 2010. Første halvdel af bladposerne blev af logistiske årsager taget op 4. feb. 2011, og resten den 2. marts 2011. Ved hvert optag blev to netposer – en fin- og en grov-masket indsamlet og tørret i 24 timer, for derefter at blive vejte. Under vejning blev evt. sedimentrester og algebelægninger penslet af bladene, der stadig havde en tilstrækkelig god struktur til, at dette ikke skadede dem. Omsætningen af bladpladerne blev fundet som hældningen på en lineær regression på et plot af % masse tilbage ved tiden 0, efter første optag

(39 dage) og sidste optag (65 dage). Iturivernes omsætning af det tilsatte blad-detritus bestemtes som forskellen i nedbrydningsraten (vægttabet over tid) mellem de to typer bladposer.

På samme datoer blev alle kamre undersøgt for hvor mange levende dyr der var til stede. Dette var det eneste tidspunkt, hvor en grundig optælling kunne foregå. Disse to optællinger (mortalitetsdata 1) anses imidlertid for at være forbundet med stor usikkerhed. Derfor udførtes et nyt overlevelseseksperiment ved slutningen af forsøget (mortalitetsdata 2), hvor alle tilbageværende oprindelige dyr blev forsøgt fjernet, hvorpå én *Theodoxus fluviatilis*, én *Asellus aquaticus* og én *Gammarus lacustris*, alle hentet i Esrum sø blev tilsat kamrene i april 2011. Her blev smådyrenes overlevelse registreret gennem eksperimentet. Dyrenes levetid blev brugt som mål for eventuelle effekter af pesticidbehandlingen. Det var meget svært at få øje på dyrene og derfor registreredes levende individer. Det betyder, at hvis der blev registreret et levende individ for første gang på den 22. forsøgsdag, er dette individ registreret som levende på alle de foregående forsøgsdage. Det betyder også, at jo længere henne i forsøgsperioden, man kommer, jo større usikkerhed er estimeret af overlevelse behæftet med, fordi der ligger færre registreringsdage bag tallet. Af samme årsag er tallene fra den sidste registreringsdag ikke brugt til andet end at redigere bagudrettet som beskrevet ovenfor, da de gav en falsk lav overlevelse. Det skal understreges, at der er tale om meget få individer for hver behandling at teste på, hvorfor resultater baseret på disse data skal fortolkes varsomt.

I erkendelse af at det var svært at genfinde dyrene som blev tilsat mikrokosmoskamrene, og det dermed var forbundet med anseelig usikkerhed at bestemme tæthed, dødelighed, og dermed også ituriver- og græsningstryk, udførtes supplerende eksperimenter i petriskåle. Formålet med disse undersøgelser var at adskille en eventuel effekt af pesticidbehandlingerne fra tilstedeværelse af iturivere og græssere på omsætning af bladdetritus og algevækst, samt at bestemme behandlingernes effekt på dødeligheden af dyrene. De arter, der indgik i forsøget var de samme som i mikrokosmos, bortset fra at ferskvandstangloppen *Gammarus pulex* nu blev erstattet af *Gammarus lacustris*. Alle dyrene blev hentet i Esrum sø i marts og april 2011. I 90 glaspetriskåle med låg og med en diameter på 7,5 cm og en højde på 1 cm blev der anbragt lidt glødet sand og to keramiske kakler (2,3 x 2,3 x 0,4 cm). Petriskålene blev fyldt med vand fra Esrum sø uden pesticider samt lidt bentisk algemateriale fra Pøle å, hvorefter opstillingen stod i 14 dage, så der kunne opbygges en algebiomasse på kaklerne. Der blev desuden anbragt 6 ekstra petriskåle med samme indhold, som efter de fjorten dage med etablering af perifyton blev brugt til at bestemme kaklernes initiale algebiomasse. Herefter blev der, i hver af de 90 petriskåle, anbragt en tørret bøgebladsskive. I halvdelen (dvs. 45) af petriskålene blev der desuden tilsat en af hver af arterne *G. lacustris*, *A. aquaticus* og *T. fluviatilis* (indenfor arten var individerne af nogenlunde samme størrelse) og det pesticidfri vand blev erstattet af vand med de forskellige behandlinger i samtlige petriskåle. Der anvendtes de 15 behandlinger i tre replikater i de 45 petriskåle uden dyr og i tre replikater i de 45 petriskåle med dyr (se tabel 1). Petriskålene blev placeret i tilfældig rækkefølge på et bord ca. 40 cm. under 8 lysstofrør (54 W, 10000 K) indsat i fatning der reflekterede lyset, som var tændt 14 timer i døgnet. Der blev opsat reflekterende papir i enderne af forsøgsopstillingen for at undgå forskel i lystilgang til de forskellige petriskåle. Igennem hele forsøgsperioden på 35 dage blev der skiftet vand i petriskålene en gang om ugen. Dette blev gjort ved at suge det gamle vand op med en plastikpipette og derefter tilsætte frisk vand med den rette pesticidbehandling. Mellem disse vandskifter blev der efterfyldt med vand i de petriskåle, hvor der var fordampet så meget

vand, at det kunne ses. Dødeligheden af makroinvertebrater blev registreret og døde individer blev fjernet i alt 13 gange med 2-5 dages mellemrum. Ved forsøgets afslutning blev bladpladerne tørret i et døgn ved 100°C og vejjet. Midtvejs i forsøgsperioden blev der målt klorofyl på de kakler, hvor *T. fluviatilis* var død, for at undgå den tilsløring af sneglenes græsning der ville komme, hvis kaklerne groede til med alger inden forsøgets afslutning.

Nedbrydningsintensitet i sedimentet bestemtes ved at måle opløst uorganisk kulstof (DIC) udtaget fra 4 cm dybde med kapillærrør. Røddernes miljø vurderedes ved måling af akkumulering af fytotoxiner i porevand (ammonium og ferrojern) udtaget med mikrokapillærer i 4 cm dybde, (Møller & Sand-Jensen 2008). Porevand blev udtaget med Hamiltonglaskanyle 100 eller 50 µL (NH₄ hhv. Fe⁺⁺) fra to rør. Prøverne blev overført til kuvette med indhold. Herefter skyllet med demineraliseret vand tre gange inden næste prøveudtagning. Ammonium blev analyseret efter phenolhypochlorit-metoden, og ferrojern efter o-phenanthrolin-metoden (Limnologisk Metodik, Ferskvandsbiologisk Laboratorium, KU).

Bladenes velbefindende vurderedes non-destruktivt undervejs i eksperimentet ved måling af fotosyntese og fotosystem II aktivitet vha. fluorescens fra klorofyl a (PAM metodik). Denne metodik har vist sig meget effektiv til påvisning af bentazon-effekt på kiselalger (Macedo et al. 2008). Kamrene blev mørklagt min 30 min med stanniol, og lampen i klimarummet dækket med et viskestykke, for at forhindre lys. Der blev målt på 3 el. 4 blad fra centrum. Analysen leverer i sidste ende et tal mellem 0 og 1 (Fv/Fm). Tallet 0 angiver, at klorofylet er helt inaktivt. Tallet 1 angivet, at alle fotosyntetiske centre er fuldt aktive og der ikke er nogen svækkelse af det emitterede signal. I praksis angiver værdier mellem 0,8 og 0,95 et sundt og aktivt fotosystem.

Systemernes (kamrenes) totale primærproduktion og respiration blev kvantificeret ved at måle ændring i iltkoncentration i vandet over tid i lys og mørke i lukkede vandsøjler, der ikke tillod udveksling af gasser med atmosfæren. Vandtilførslen i kammeret blev stoppet. Ca. 50 mL vandprøve blev udtaget med engangssprøjte med slangestykke efter rolig omrøring med glasspatel i 15 sek., og fyldt i en 25 mL flaske fra bunden. Efter at have gennemskyllet flasken blev denne lukket og det resterende vand hældt tilbage i kammeret og flasken opbevaret mørkt. Kammeret blev lukket med plastiklåg. Iltindholdet blev målt efter termostatering ved 15,3 grader i vandbad (mørke) med en ilt-mikroelektrode, der ikke er følsom for omrøring (OX500, Unisense). Efter 3-4 timer i lys blev låget på kamrene fjernet, vandet blev omrørt som før og en ny vandprøve udtaget. Kammeret blev derpå lukket igen og herefter mørklagt med stanniol i en tilsvarende tidsperiode. En vandprøve blev udtaget og iltindholdet målt som før. Endelig blev vandstanden i kammeret målt med lineal. Princippet i beregningerne er A = initial O₂ koncentration; B = O₂ koncentration efter lysperioden; C = O₂ koncentration efter mørkeperioden; Produktion = B – A; Respiration = C – B.

En lille netpose ca. 2 x 5 cm lavet af fint (40 µm nylonnet) fyldt med sand fri for svampehyfer blev initielt lagt i sedimentet i hvert kammer. Disse poser tillader indvækst af svampehyfer, men ikke af rødder (Møller et al., upubl.). Ved afslutning af eksperimentet blev mykorrhizasvampenes vækst kvantificeret ved mikroskopisk tælling af svampehyfer i sandet fra disse poser. Kvantificering af eksternt mycelium fra sedimentet skete ved at opslemme en prøve af sandet fra poserne i 50 ml vand, homogenisere i Sorvall blender på max hastighed i 30 s, sigte forsigtigt igennem en 8 µm sigte, overføre sedimentet/hyfer til et 50 ml plastrør og fyld op med vand til 30 mL, ryste plastrøret

og lad henstå i 30 s, overføre 5 mL til filtre, tilsætte 2 ml 0,1% trypanblå i laktoglycerol og farve i 5 min. De to filtre overførtes til et objektglas og tørrede, tilsattes 4-5 dråber (lakto)glycerol, og dækglass blev lagt på. Fra hver prøve (kammer) målt ved 200 x forstørrelse vha. net i objektiv antal hyfeskæringer på 2 præparater med 10 tællinger på ydergitter på hver (Kjøller & Rosendahl, 2000)

Ved afslutningen af eksperimentet blev lobelieplanternes vækst og overlevelse bestemt ved tælling og vejning af planter, blade og rødder.

2.5 Amfibiske planter fra vandløb (del 2)

Formålet med dette deleksperiment var at undersøge cocktaileffekter af langtidseksponering af grundvandsrealistiske koncentrationer af pesticider på vækst og stofomsætning i samfund af amfibiske planter i mikrokosmos. Forventningen var, at planterne ville være robuste overfor pesticiderne i vandfasen fordi de dels er i stand til at vokse ud af vandet, dels ikke er afhængige af rod-symbiose med mykorrhiza-svampe.

Den eksperimentelle opstilling er den samme som beskrevet under del 1, hvorfor der henvises til denne. Den 28. juli 2011 blev de 45 mikrokosmoskamre etableret med ca. 11 cm sediment som bestod af indkøbt 1 mm kvartssand blandet med ca. 0,8 dl tykt mørkt organisk mudder (~ 2 % volumen og 0,1 % tørvægt) filtreret gennem en 1 mm sigte og hentet i Selbækken uden for Hillerød. Dette sediment var således relativt løst, ukonsolideret og med et betydeligt lavere organisk indhold end i del 1. I begyndelsen af august 2011 hentedes skud af tykbladet ærenpris (*Veronica beccabunga*) og vandmynte (*Mentha aquatica*) i Selbækken og af vandstjerne (*Callitriche* sp.) i Pøleåen, begge beliggende tæt på Hillerød. I hvert af de 45 mikrokosmoskamre blev der plantet et skud på ca. et gram frisk vægt af hvert af disse arter, bortset fra vandstjerne, hvor denne vægt udgjordes af flere skud. De to førstnævnte arter blev plantet med toppen over vandoverfladen. På Billede 2 ses den færdige opstilling.



BILLEDE 2

MIKROKOSMOSKAMRE MED TYKBLADET ÆRENPRIS, VANDMYNTE OG VANDSTJERNE UNDER DEL 2.

Til gennempumpning af kamre anvendtes hanevand fortyndet 5 gange med ionbyttet vand. Kamrene fik lov at hvile og planterne slå rødder i 4 uger før pesticidbehandlingerne blev igangsat i begyndelsen af september. Da planterne begyndte at vise tegn på næringsbegrænsning fik alle kamre et par gange gennem forsøgsperioden tilført en gødningspind, som også benyttes til potteplanter for at undgå næringsbegrænsning.

Hvide keramiske kakler (2,3 x 2,3 x 0,4 cm) blev lagt i kamrene i slutningen af september og optaget 2 gange gennem eksperimentet og klorofyl-a (biomasse) målt som for delforsøg 1. Dyr blev ikke tilsat i dette eksperiment, men skiver af tørrede bøgeblade i poser med 0,5 cm maskevidde blev lagt i som under delforsøg 1, med to gange optag gennem eksperimentet.

Nedbrydningsintensitet i sedimentet blev bestemt ved at måle opløst uorganisk kulstof (DIC) udtaget fra 4 cm dybde med kapillærrør. Røddernes miljø vurderedes ved måling af akkumulering af fytotoxiner i porevand (ammonium og ferrojern) udtaget med mikrokapillærer i 4 cm dybde, (Møller & Sand-Jensen 2008). Porevand udtaget med Hamiltonglaskanyl 100 eller 50 uL (NH_4 hhv. Fe^{++}) fra to rør. Analyser udført som anført under del 1.

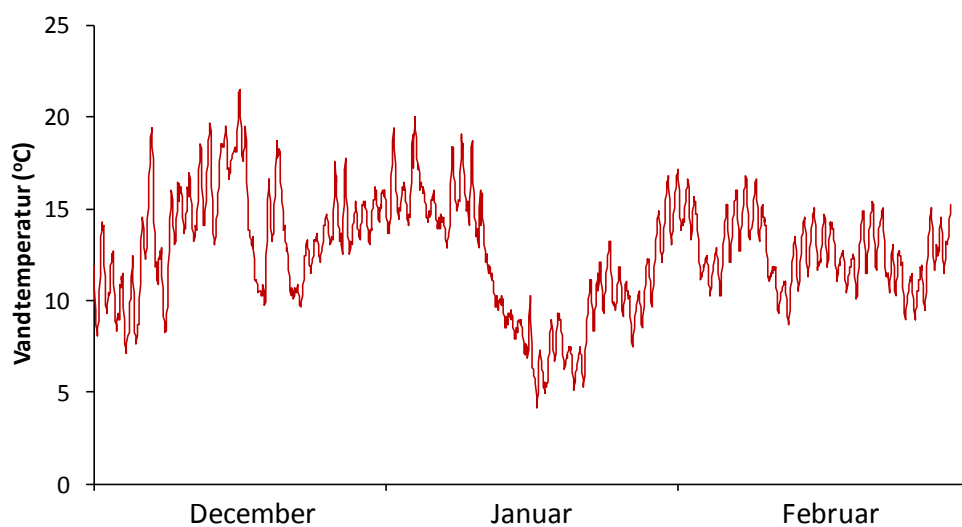
Mod slutningen af eksperimentet blev der målt helkammermetabolisme ved forbrug (= primærproduktion) og produktion (= respiration) af CO_2 . En tætsiddende gennemsigtig plexiglas top (med kendt volumen) blev placeret oven på hvert kammer. Herefter påbegyndtes gennempumpning af atmosfærisk luft (med kendt CO_2 indhold) direkte til vandet i kammeret. En slange ledte udførselsluften til en infrarød gas analysator (IRGA, LiCor, Lincoln), der analyserer indholdet af CO_2 . Der antages således at koncentrationen af CO_2 i udførselsluften er i ligevægt med vandet i kammeret. Disse målinger blev udført over 3 – 4 timer i både lys og mørke ændringer i koncentrationen af CO_2 anvendtes til beregning af produktion og respiration. Beregningsprincippet svarer til den angivet i afsnit 2.4, ved antagelse af en respiratorisk kvotient på 1 (dvs. 1 mol O_2 svarer til 1 mol CO_2).

Ved forsøgets afslutning blev der for mynte og ærenpris registreret antal skud, skudlængde, rodlængde, skud tørvægt, rod tørvægt samt skud:rodvægts forhold. For vandstjerne blev kun total plantevægt anvendt.

2.6 Planter og dyr i hydroponisk kultur (del 3)

Formålet med dette deleksperiment i hydroponisk kultur, altså vandkultur uden sediment, var at teste om tilstedeværelsen af naturlige matrix af sediment har en afgiftende effekt på pesticider i grundvandsrealistiske koncentrationer, og således nedsætter effekter på vækst og overlevelse af grundskuds- og amfibiske planter. Forventningen var, at eksperimentet ville bekræfte de tidligere manglende effekter af pesticider fra opstillinger med sediment til stede.

Eksperimentet blev udført fra november 2012 til februar 2013 i et tilbygningsskur på Ferskvandsbiologisk Laboratorium. Temperaturen i de eksperimentelle kamre fulgte således til en vis grad variationerne i udendørstemperaturen i denne periode (Figur 2).



FIGUR 2
VANDTEMPERATUREN I DE EKSPERIMENTELLE KAMRE I DEL 3.

I dette delforsøg anvendtes en anden opstilling og et ændret design i forhold til de to foregående delforsøg. Som eksperimentelle enheder blev der nu benyttet nye hvide 5 L plastikspande. Disse blev ikke tilført nogen form for sediment, men blot 2L vand (50% demineraliseret og 50% hanevand). Der var således ingen form for gennemstrømning.

I hver spand blev der tilført et individ af planterne tvepibet lobelie og strandbo, samt skud af tykbladet ærenpris og vandmynte. Planterne var tilnærmelsesvis af samme størrelse, blev fordelt tilfældigt, og holdt neddykket i vandet ved forsigtigt at placere plastickeklammer ved overgang fra blade til rødder (to førstnævnte) eller omkring stænglen (to sidstnævnte). Desuden blev der til hver spand tilført to tørrede og vejede bøgeblade (hentet i Fønstrup bæk) til kvantificering af nedbrydning, samt en hvid keramisk kakel (2,3 x 2,3 x 0,4 cm) til registrering af algepåvækst. Til den ene halvdel af spandene blev der yderligere tilsat en ferskvandstangloppes, to vandbænkebidere og to flodneritter, alle hentet i Esrum sø.

Antallet af kombinationer af pesticider blev reduceret til ni (Tabel 2), men til gengæld blev hver behandling udført i ti replikater ialt, fem med dyr, og fem uden dyr. Der var således 90 eksperimentelle kamre (Billede 3).

TABEL 2
DOSERINGSSKEMA FOR 9 BEHANDLINGER AF DE TRE PESTICIDER.
o = INTET (KONTROL), L = LAV (0,05 µGL⁻¹), H = HØJ (5 µGL⁻¹).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Bentazon (Herbicide)	o	L	o	o	H	o	o	L	H
Propiconazol Fungicide)	o	o	L	o	o	H	o	L	H
Pyrimicarb (Insekticide)	o	o	o	L	o	o	H	L	H



BILLEDE 3
DEN EKSPERIMENTELLE OPSTILLING TIL DEL 3

Lyscyklus blev sat til 16 timer lys og 8 timer mørke. Der blev til udvalgte spande tilsat små Tidbit temperaturloggere.

For at sikre tilstedeværelse af passende mængder af både CO_2 og HCO_3 på samme tid (for at tilgodese alle de medvirkende planters forskellige optag af uorganisk kulstof) blev pH jævnlige sænket til ca. 7, og alkaliniteten til ca. $2,5 \text{ meq L}^{-1}$ ved at tilsætte vand 6 gange overmættet med kulsyre. Omtrent hver 14. dag blev der tilsat en anelse næring i form af CaCl_2 , MgSO_4 , NaSO_4 , K_2SO_4 , Fe på citratform, N & P-opløsning og Z8 (sporstofblanding) for at forhindre begrænsning med næringsstoffer.

På grund af fordampning blev der løbende suppleret med 50/50 demineraliseret/hanevand. Ved hyppige vandskift var det hensigten at "mætte" spandenes sorption og derved opnå pesticidkoncentrationer tæt på de nominelle. Ved vandskift og dermed tilsætning af frisk pesticidblanding blev 1L af det eksisterende vand i spanden udtaget via hævertsystem, og der blev derefter tilsat 1L frisk blanding. Der blev skiftet vand og tilsat pesticider hver 14. dag.

Ved forsøgets afslutning blev der for tvepibet lobelie og strandbo registreret antal grønne blade, længste blad, længste rod, blad tørvægt, rod tørvægt og blad:rodvægts forhold; og for strandbo tillige antal udløbere. For mynte og ærenpris blev der registreret antal skud, skudlængde, rodlængde, skud tørvægt, rod tørvægt samt skud:rodvægts forhold.

Fauna blev registreret hver eller hver anden dag i begyndelsen, senere blot to gange ugentligt. Antal levende individer blev noteret. Hvis et individ gentagne gange ikke kunne genfindes, blev det efter endt forsøgsperiode (hvor alt i spanden blev gennemundersøgt) registreret som dødt ved første dato, hvor individet ikke kunne erkendes.

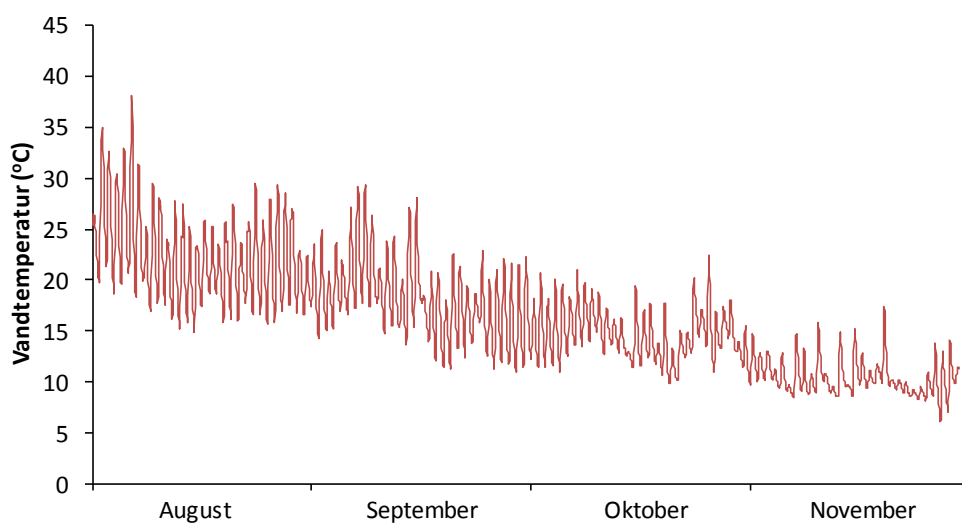
Kaklerne blev behandlet og klorofyl ekstraheret som i delforsøg 1 og 2. Bøgebladene blev taget op af spandene efter 39 dages eksponering, og efter tørring i varmeskab blev de vejte.

For at verificere de nominelle koncentrationer af de tre pesticider blev der den 14. februar 2013, umiddelbart før eksperimentets afslutning, udtaget 9 vandprøver, tilfældigt udvalgt blandt de ti replikater af hver af de 9 behandlinger, og umiddelbart derefter sendt til analyse.

2.7 Interaktion: næring og pesticider (del 4)

Formålet med dette deleksperiment var at undersøge om næringssalttilgængelighed påvirker effekten af pesticider på overlevelse og vækst af etablerede samfund af grundskuds-, vandskuds- og amfibiske planter i mikrokosmos. Forventningen var at god næringstilgang ville gavne væksten af de hurtigt voksende planter på bekostning af rosetplanterne.

Eksperimentet blev igangsat 20. august og afsluttet 4. december 2013, og blev udført i Ferskvandsbiologisk Laboratoriums væksthuse på taget af Universitetsparken 4, København. Temperatur og lys fulgte således til en vis grad udendørstemperaturen, og faldt således markant gennem perioden (Figur 3). Dog blev vandtemperaturen visse dage i begyndelsen af eksperimentet så høj at det muligvis har påvirket planternes trivsel.



FIGUR 3
VANDTEMPERATUREN I DE EKSPERIMENTELLE KAMRE I DEL 4.

I dette delforsøg anvendtes igen nye hvide 5L plasticspande som eksperimentelle enheder, men for at kunne inkludere næringssaltniveau som ekstra variabel blev opstillingen igen ændret i forhold til tidligere. Til hver spand blev der tilsat ca. 5 cm sandbundssediment hentet i Skånes Värnsjö og 12 cm (3L) vand (10% vand fra Esrum sø og 90 % demineraliseret vand). Der var således ingen form for gennemstrømning. I hver spand blev der plantet et individ af planterne tvepibet lobelie, strandbo (hentet i Skånes Värnsjö), og små skud af planterne kruset vandaks (*Potamogeton crispus*), vandpest (*Elodea canadensis*), tykbladet ærenpris (*Veronica beccabunga*) (hentet i Esrum å) og vandmynte (*Mentha aquatica*) (hentet i Køge å).

TABEL 3

DOSERINGSSKEMA FOR 8 BEHANDLINGER AF DE TO PESTICIDER I DELFORSØG 4.

o = INTET (KONTROL), H = HØJ ($5 \mu\text{gL}^{-1}$).

	A	B	C	D	E	F	G	H
	Lav Næring				Høj Næring			
Bentazon (Herbicide)	o	H	o	H	o	H	o	H
Propiconazol Fungicide)	o	o	H	H	o	o	H	H

Der blev arbejdet med otte kombinationer af høj koncentration ($5 \mu\text{gL}^{-1}$) af herbicidet bentazon og fungicidet propiconazol og lav og høj næring (Tabel 3). Hver behandling blev udført i seks replikater. Der var således 48 eksperimentelle kamre (Billede 4).

**BILLEDE 4**

DEN EKSPERIMENTELLE OPSTILLING TIL DEL 4.

Alle planterne blev før udplantning vejlet (vådvægt - VV). Efter 3 uger blev der til halvdelen af spandene tilsat 2 stk næringspiller (Osmocote Roser, Produkt kode: A-7664; The Scotts Company A/S) i sedimentet ved hver plante (altså 12 næringspiller ialt i hver spand), samt 3 ml af en stamopløsning af de to pesticider til de relevante spande. Disse blev i oktober suppleret med andre næringspiller (Animix Rosengødning, N-P-K 10-2-9, Bayer A/S). Der blev til hver spand tilført en lille hvid karamiske kakel ($2,3 \times 2,3 \times 0,4 \text{ cm}$) til registrering af algepåvækst. Der blev til udvalgte spande tilsat små Tidbit temperaturloggere (se Figur 3).

Ved afslutningen af eksperimentet blev der udtaget 8 vandprøver (fra lav og høj næring), disse blev frosset, og efterfølgende anvendt til bestemmelse af flere vandkemiske parametre. Alkalinitet blev målt ved Gran-titrering med $0,01\text{M HCl}$ i pH intervallet 4,4-3,7 målt med en Radiometer elektrode (model PHC2001-8 pH kombi elektrode). Total N og total-P blev målt spektrofotometrisk efter våddestruktion med persulfat. N blev målt på autoanalyser (ALPKEM 301) og P direkte på spektrofotometer (SHIMADZU UV-1800).

Ved hyppige vandskift (ca. hver 8.-10. dag, dog hyppigere i begyndelsen) var det hensigten at "mætte" spandenes sorption og derved opnå pesticidkoncentrationer tæt på de nominelle. På grund af fordampning blev der løbende suppleret med demineraliseret vand. Omtrent hver 14. dag blev $1/3$ af vandet udskiftet og tilsat koncentreret pesticidopløsning for at opretholde koncentrationen.

For at verificere de nominelle koncentrationer af de to pesticider blev der 15. oktober og 18. november 2013 (sidstnævnte umiddelbart før eksperimentets afslutning), udtaget 8 vandprøver, én tilfældigt udvalgt blandt de seks replikater af hver af de 8 behandlinger, og umiddelbart derefter sendt til analyse.

Ved forsøgsafslutning blev alle planter delt i skud+blade og roddele og friskvægten bestemt. Der blev i dette eksperiment testet på vækstrater og skud:rodvægts forhold.

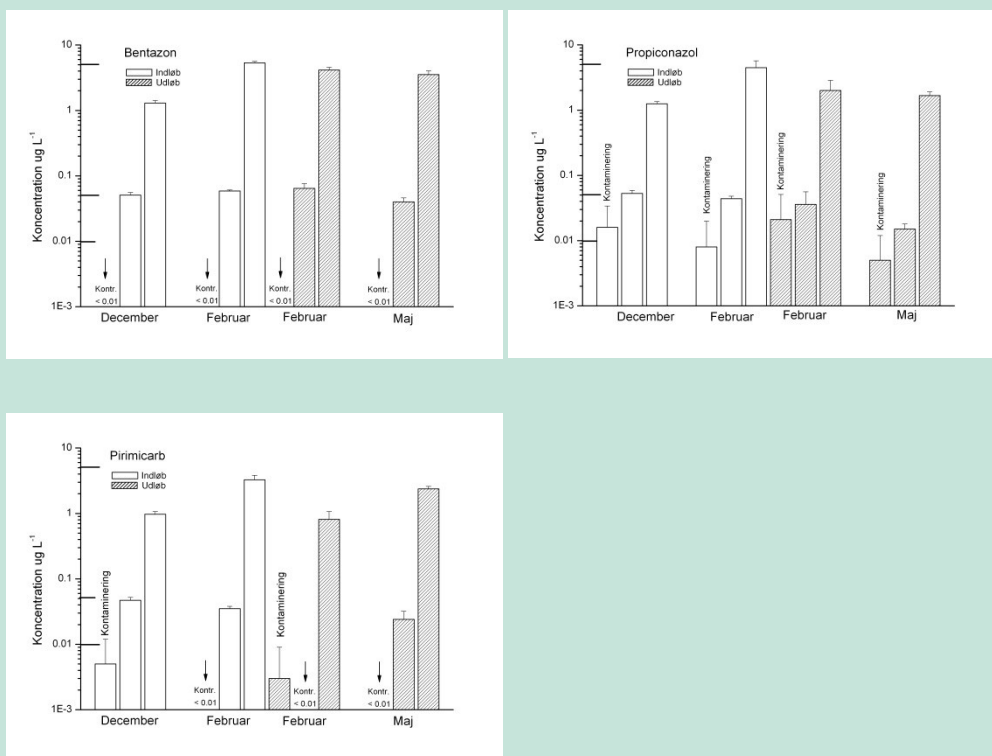
3. Resultater

3.1 Grundskudsplanter og smådyr fra sø (del 1)

3.1.1 Pesticidkoncentrationer

Indledningsvis var indløbskoncentrationerne til kamrene af alle tre pesticider lavere end de tilsigtede nominelle koncentrationer, og i samme måleperiode var udløbskoncentrationerne konsekvent lavere end indløbskoncentrationerne (Figur 4). Disse forhold beskrives tydeligst ved at se nærmere på den høje nominelle behandlingskoncentration ($5 \mu\text{g L}^{-1}$). For bentazon var koncentrationen i indløbet $1,300 \mu\text{g L}^{-1}$ i december (26 % af nominelle), og $5,325 \mu\text{g L}^{-1}$ i indløbet (lidt over nominelle) mod $4,150 \mu\text{g L}^{-1}$ i udløbet i februar (78 % af indløbet). For propiconazol var koncentrationen i indløbet $1,250 \mu\text{g L}^{-1}$ i december (25 % af nominelle), og $4,475 \mu\text{g L}^{-1}$ i indløbet (90 % af nominelle) mod $2,000 \mu\text{g L}^{-1}$ i udløbet i februar (45 % af indløbet). For pirimicarb var koncentrationen i indløbet $0,970 \mu\text{g L}^{-1}$ i december (19 % af nominelle), og $3,275 \mu\text{g L}^{-1}$ i indløbet (65 % af nominelle) mod $0,813 \mu\text{g L}^{-1}$ i udløbet i februar (25 % af indløbet). Disse forhold tilskrives initial adsorption i indløbssystemet (dunke og slanger). Midtvejs i forsøget (februar) opnåedes stort set de tilsigtede koncentrationer i indløbsvandet, mens der blev målt lavere koncentrationer i udløbsvandet, særligt for propiconazol og pirimicarb. Ved afslutningen af forsøget var udløbskoncentrationerne for alle tre stoffer tæt på de tilsigtede nominelle.

Der blev i nogle tilfælde målt koncentrationer af propiconazol og pirimicarb i kontroller som lå over detektionsgrænsen ($= 0,01 \mu\text{g L}^{-1}$). For pirimicarbs vedkommende gælder det kun for indløbsvand i december, hvor der i to ud af seks stikprøver blev målt maksimalt $0,015 \mu\text{g L}^{-1}$. Problemet var mere udtalt for propiconazol, hvor der i alle fire stikprøveserier blev fundet koncentrationer på op til $0,079 \mu\text{g L}^{-1}$, og i to til fire af de seks udtagne prøver per serie. Dette kunne tyde på utilsigtet kontaminering enten i forsøgene eller analyserne. Der blev ikke fundet tegn på krydskontaminering.

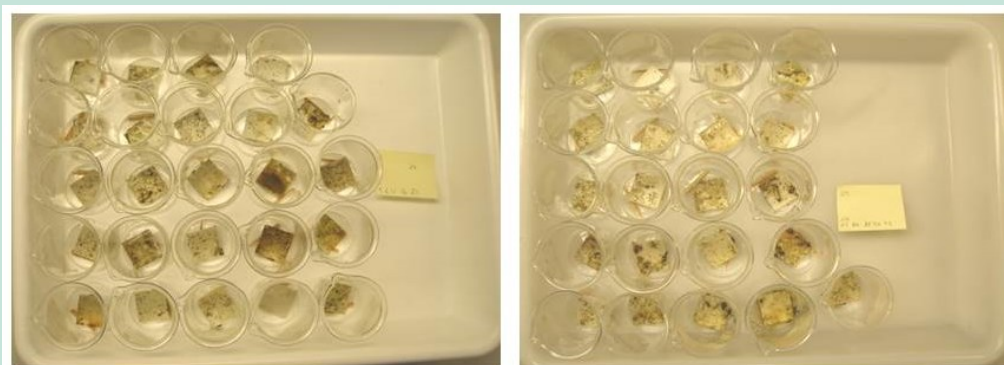


FIGUR 4

GENNEMSITLIGE KONCENTRATIONER (\pm SE) I INDLØBS- OG UDLØBSVAND AF DE TRE PESTICIDER I DELFORSØG 1. DE VANDRETTE STREGER PÅ Y-AKSEN ANGIVER DE NOMINELLE, TILSIGTEDE KONCENTRATIONER FOR KONTROL ($< 0.01 \mu\text{g L}^{-1}$), LAV OG HØJ KONCENTRATION. DER ER ANGIVET GENNEMSNITSVÆRDIER FOR STIKPRØVERNE, DERFOR KAN VÆRDIER UNDER DETEKTIONSGRÆNSEN FOREKOMME.

3.1.2 Algevækst, nedbrydning af blad detritus og faunamortalitet

Algebiomassen på kaklerne blev bestemt efter 43, 135 og 183 dage, og de tilsvarende tilvækstrater udregnet for periode 1 (dag 0 - 43), periode 2 (dag 47 - 135) og periode 3 (dag 0 - 183).



BILLEDE 5

KAKLER MED VÆKST AF ALGER FRA MIKROKOSMOSKAMRE I DELFORSØG 1, VED FØRSTE OPTAG EFTER 43 DAGE.

Den gennemsnitlige algebiomasse nåede et konstant niveau i løbet af mindre end 43 dage, idet den efter periode 1 var $1,04 \mu\text{g klo } a \text{ cm}^{-2}$, mens der i periode 2 blev opbygget $0,91 \mu\text{g klo } a \text{ cm}^{-2}$ og i hele periode 3 blev opbygget $0,99 \mu\text{g klo } a \text{ cm}^{-2}$. Der var meget stor variation i algebiomasse mellem enkeltkamre og mellem gennemsnit af pesticidbehandlinger (Billede 5), og der blev ikke fundet signifikante forskelle mellem behandlinger og perioder. Bentazon analyseret særskilt (med varierende koncentration af de to andre pesticider) viste heller ingen effekt på opbygning af algebiomassen efter periode 1.

Nedbrydning af bladpladerne i mikrokosmos var hverken påvirket af behandling eller posetype (finmasket vs. grovmasket), ej heller fandtes der nogen interaktionseffekt. Som gennemsnit havde bladpladerne ved slutningen af forsøget tabt 90,1 % i vægt i de grove og 87,8 % i de fine poser. Dette betyder at ituriverne ikke har bedraget til nedbrydning af blade i mikrokosmoskamrene.

Ekspontielle funktioner fittet til mortalitetsdata for de tre arter af smådyr (% overlevende individer) viste meget høj forklaringskraft ($R^2 = 0,94 - 0,98$). Disse angav at mindst 50 % af *Gammarus lacustris*, *Asellus aquaticus* og *Theodoxus fluviatilis* stadig var i live efter henholdsvis 8, 10 og 25 dage. Der var ingen effekt af pesticidbehandlinger på overlevelsen af nogen af arterne af smådyr, hverken ved første (mortalitetsdata 1) eller anden opgørelse (mortalitetsdata 2), ej heller af forskellige koncentrationer af pirimicarb (med varierende tæthed af de to andre pesticider).

3.1.3 Ammonium, ferro-jern og uorganisk kulstof i sediment

Koncentration af ammonium, ferrojern og opløst uorganisk kulstof (DIC) i sedimentets porevand blev målt ved eksperimentets begyndelse (26. november) og afslutning (11-18. marts). Ferrojern kunne ikke detekteres, hverken i kontroller eller ved pesticideksponering. Der var altså ingen tegn på, at røddernes iltudskillelse var hæmmet og ferrojern af den grund blev ophobet. Ved udtagning af 10 gange større volumen (500 μL fra et kammer) blev absorptionsen ca. 10 gange større (0,015 mod 0,001), hvorfor det formodes at koncentrationen af ferrojern reelt var under detektionsgrænsen.

Den gennemsnitlige koncentration af ammonium var ved start $409 \mu\text{M}$ ($\pm 1767 \text{ SD}$), og ved afslutning $828 \mu\text{M}$ ($\pm 743 \text{ SD}$). Den gennemsnitlige koncentration af DIC var ved start $0,780 \text{ mM}$ ($\pm 0,060 \text{ SD}$) og ved afslutning $1,106 \text{ mM}$ ($\pm 0,227 \text{ SD}$). Der var ingen effekt af pesticidbehandlingerne.

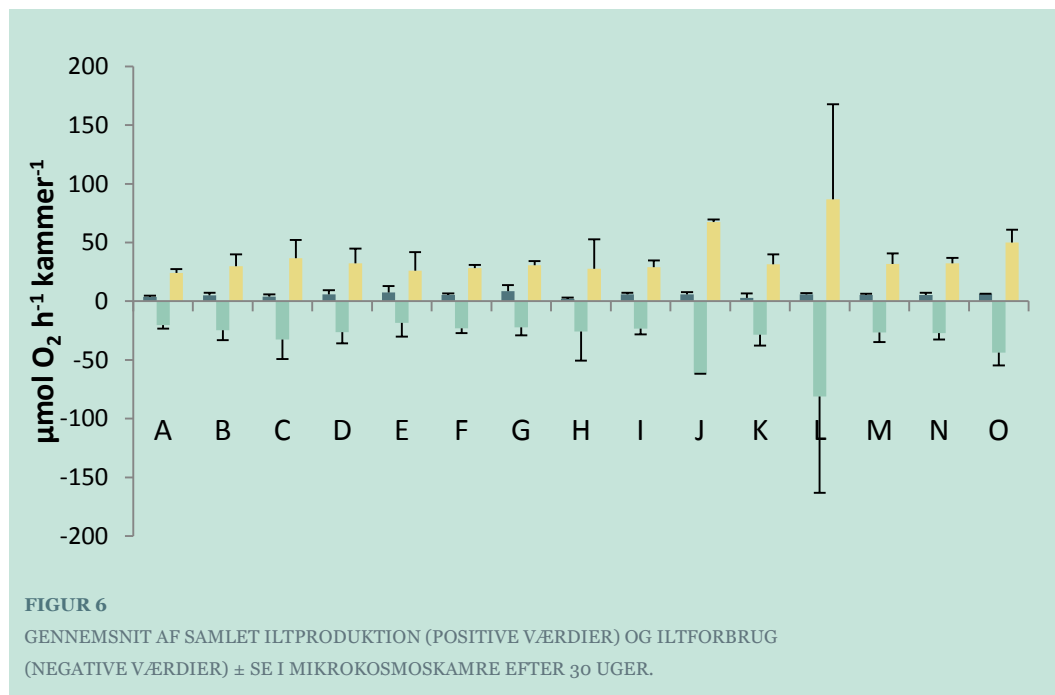
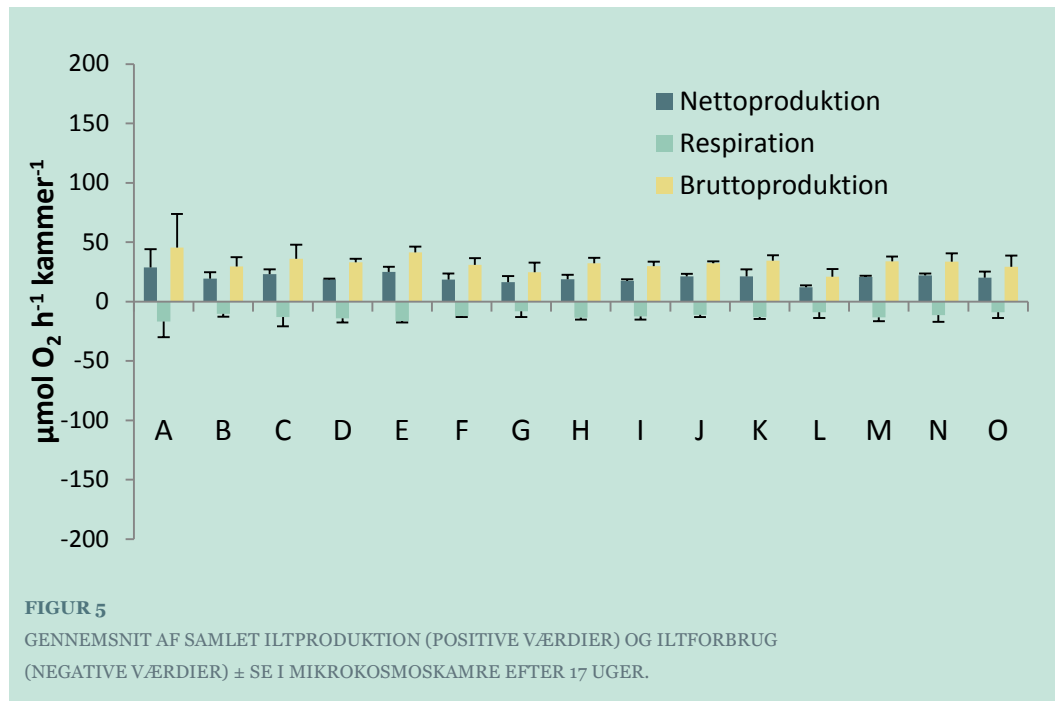
Der var signifikant effekt af de 15 pesticidbehandlinger i forhold til kontrollerne på slutkoncentrationen af ammonium ($F_{14,30} = 5,671$; $P < 0,001$) og DIC ($F_{14,29} = 3,823$; $P = 0,001$). Der var imidlertid ingen effekt af hvert af de tre pesticider testet særskilt (med varierende koncentration af de to andre pesticider).

3.1.4 Iltforbrug og produktion i kamre

Brutto iltproduktion, respiration og netto iltproduktion blev målt i hvert kammer efter 17 og 30 uger. Der var stor variation mellem enkeltkamre, særligt ved anden måling (Figur 5 og 6). Der var ingen korrelation mellem første og anden måling for nogen af disse parametre. Der var ingen forskel på den gennemsnitlige bruttoproduktion mellem første og anden måling, mens

respirationen var signifikant højere ($t_{41} = 16,330$; $P < 0,001$), og nettoproduktionen således signifikant lavere ved anden måling sammenlignet med første måling ($t_{41} = 5,170$; $P < 0,001$).

Der var ingen effekt af pesticidbehandlingerne på de tre responsparametre, hverken ved første eller ved anden måling, og dette gælder både ved sammenligning af de 15 behandlinger, og ved test på de tre forskellige niveauer af hvert enkelt stof hver for sig (med varierende koncentrationer af de andre 2 stoffer).



3.1.5 Fotosyntese hos tvepibet lobelie

Den gennemsnitlige fotosyntesekapacitet fra PAM målinger af lobelieblade var næsten uændret fra forsøgsstart i november ($0,405 \pm 0,211$ SD), og 4 måneder senere i marts ($0,475 \pm 0,135$ SD). Der var ingen signifikant effekt af pesticidbehandlingerne på fotosyntesekapaciteten, hverken testet som 15 forskellige behandlinger eller ved en sammenligning af de 3 koncentrationer af hvert pesticid (med varierende koncentrationer af de andre 2 stoffer).

3.1.6 Morfologiske parametre og mortalitet hos tvepibet lobelie

Der blev ikke fundet signifikante effekter af pesticidbehandlingerne på nogen af de morfologiske parametre: bladvægt plante⁻¹, bladlængde, rodvægt plante⁻¹, rodlængde eller bladvægt:rodvægt forholdet, hverken testet som 15 forskellige behandlinger eller ved en sammenligning af de 3 koncentrationer af hvert pesticid (med varierende koncentrationer af de andre 2 stoffer). På Billede 6 ses lobelieplanter efter eksperimentet.

Overordnet faldt antallet af levende lobelieplanter i kamrene signifikant gennem forsøgsperioden fra et initielt gennemsnit på 16,9 til 11,9 ved afslutningen ($t_{44} = 4,589$; $P < 0,001$). Det gennemsnitlige antal blade per plante ændrede sig ikke under forsøget (4,7 ved start vs. 4,6 ved afslutningen). Der var dog ingen signifikant effekt af pesticidbehandlingerne på mortalitet af planter eller blade, hverken testet som 15 forskellige behandlinger eller ved en sammenligning af de 3 koncentrationer af hvert pesticid (med varierende koncentrationer af de andre 2 stoffer).



BILLEDE 6

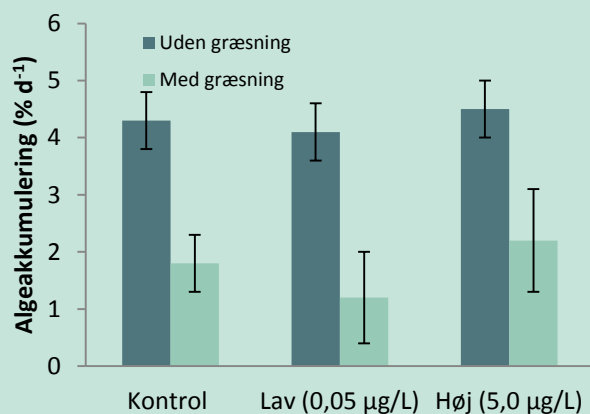
INDIVIDER AF TVEPIBET LOBELIE EFTER DEL 1.

3.1.7 Svampevækst i sediment

Der blev registreret hyfer af mykorrhizasvampe i samtlige indvækstposer placeret i sedimentet. Der var dog ingen signifikant effekt af pesticidbehandlingerne på tæthed af svampehyfer, hverken testet som 15 forskellige behandlinger osv. eller ved en sammenligning af de 3 koncentrationer af hvert pesticid (med varierende koncentrationer af de andre 2 stoffer).

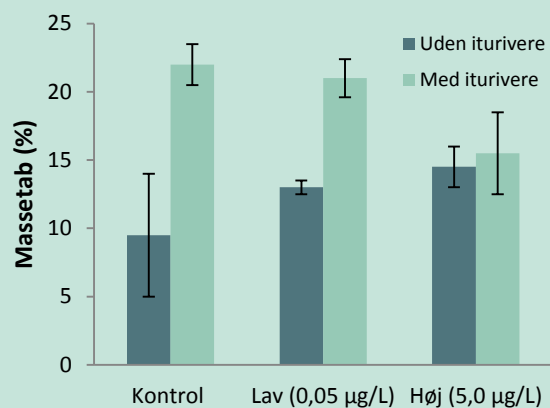
3.1.8 Eksperiment i petriskåle (supplement)

Ekspontielle funktioner fittet til mortalitetsdata for de tre arter af smådyr (% overlevende individer) viste meget høj forklaringskraft ($R^2 = 0,95 - 0,98$). Disse angav at 50 % af *Gammarus lacustris*, *Theodoxus fluviatilis* og *Asellus aquaticus* stadig var i live efter henholdsvis 13, 25 og 35 dage. Eksperimentet underbyggede resultatet fra mikrokosmosdelen, idet der ingen signifikant effekt var af pesticidbehandlingerne på hverken opbygning af algebiomasse eller nedbrydning af bladdetritus. Ved tilstedeværelsen af snegle blev der opbygget signifikant mindre algebiomasse ($F_{1,89} = 26,14$; $P < 0,001$), og under tilstedeværelsen af iturivere var massetabet af bølgebladene signifikant højere ($F_{1,89} = 10,26$; $P < 0,002$). Der var ingen interaktion mellem effekt af behandlinger og effekt af fauna. Der var ingen effekter af bentazon på tilvæksten af algebiomasse, eller af interaktion mellem bentazon og græsning (Figur 7).



FIGUR 7
BIOMASSEAKKUMULERINGSRATE (% d⁻¹) ± SE AF ALGER PÅ KAKLER VED NUL (KONTROL), LAV (0,05 µg L⁻¹) OG HØJ (5 µg L⁻¹) KONCENTRATION AF BENTAZON I PETRISKÅLE MED OG UDEN GRÆSNING.

Der var ingen effekt af behandlingerne på de tre arters levetid, ej heller af pirimicarb analyseret særskilt, eller på interaktion mellem behandlinger og arter. Der var heller ingen effekt af propiconazol på nedbrydningen af bladpladerne uden iturivere, altså den mikrobielle andel af nedbrydningen, men iturivernes effekt på nedbrydningen var signifikant lavere ved høj koncentration af propiconazol (Figur 8). I Tabel 4 opsummeres resultaterne fra deleksperiment 1.



FIGUR 8
MASSETAB (%) ± SE AF BLADPLADER VED NUL (KONTROL), LAV (0,05 µg L⁻¹) OG HØJ (5 µg L⁻¹) KONCENTRATION AF PROPICONAZOL I PETRISKÅLE MED OG UDEN ITURIVERE (DETRITIVORE).

TABEL 4
RESUME AF RESULTATERNE FUNDET I DEL 1.

	Pesticideffekt	Bemærkning
Mortalitet af planter	Ingen effekt	Generel mortalitet
Mortalitet af blade	Ingen effekt	Generel mortalitet
Bladlængde	Ingen effekt	
Bladvægt per plante	Ingen effekt	
Rodlængde	Ingen effekt	
Rodvægt per plante	Ingen effekt	
Bladvægt:Rodvægt forhold	Ingen effekt	
Fauna mortalitet	Ingen effekt	
Ituriver omsætning af bladdetritus	Ingen effekt	Lav aktivitet
Mikrobiel omsætning af bladdetritus	Ingen effekt	
Samlet iltforbrug mikrokosmos	Ingen effekt	Steg gennem forsøg
Samlet iltproduktion mikrokosmos	Ingen effekt	Uændret gennem forsøg
Algevækst på kakler	Ingen effekt	Stor variation
Org. materiale i sediment (DIC)	15 behandl. overordnet	Ingen effekt af stoffer enkeltvis
Ammonium i sediment	15 behandl. overordnet	Ingen effekt af stoffer enkeltvis
Bladfotosyntese (PAM)	Ingen effekt	Uændret gennem forsøg
Mykorrhizasvampe hyfetæthed	Ingen effekt	

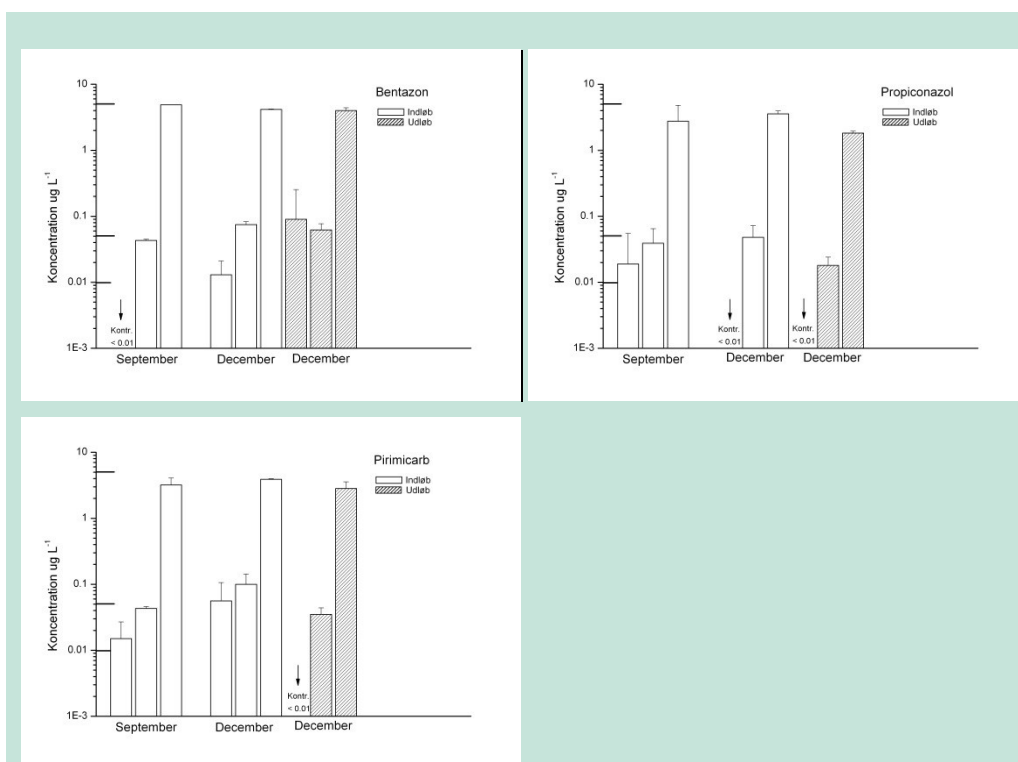
3.2 Amfibiske planter fra vandløb (del 2)

3.2.1 Pesticidkoncentrationer

Ligesom i del 1 fandtes at indløbskoncentrationerne til kamrene af alle tre pesticider var lavere end de tilsigtede nominelle koncentrationer, og i samme måleperiode var udløbskoncentrationerne

konsekvent lavere end indløbskoncentrationerne (bortset fra bentazon) (Fig 9). Disse forhold beskrives tydeligst ved at se nærmere på den høje nominelle behandlingskoncentration ($5 \mu\text{g L}^{-1}$). For bentazon var koncentrationen i indløbet $4,875 \mu\text{g L}^{-1}$ i september (reelt lig med den nominelle), og $4,175 \mu\text{g L}^{-1}$ i indløbet (84 % af nominelle) mod $4,000 \mu\text{g L}^{-1}$ i udløbet i december (96 % af indløbet). For propiconazol var koncentrationen i indløbet $2,750 \mu\text{g L}^{-1}$ i september (55 % af nominelle), og $3,575 \mu\text{g L}^{-1}$ i indløbet (72 % af nominelle) mod $1,825 \mu\text{g L}^{-1}$ i udløbet i december (51 % af indløbet). For pirimicarb var koncentrationen i indløbet $3,200 \mu\text{g L}^{-1}$ i september (64 % af nominelle), og $3,900 \mu\text{g L}^{-1}$ i indløbet (78 % af nominelle) mod $2,825 \mu\text{g L}^{-1}$ i udløbet i december (72 % af indløbet).

Alle tre pesticider blev i nogle tilfælde fundet i kontrolvand. For bentazons vedkommende i december både i ind- (max $0,024 \mu\text{g L}^{-1}$ i fem af seks stikprøver) og i udløbsvand (max $0,410 \mu\text{g L}^{-1}$ i tre af seks stikprøver). Propiconazol blev kun målt i indløbsvand i september (max $0,090 \mu\text{g L}^{-1}$ i to af seks stikprøver). Pirimicarb blev fundet i koncentrationer på max $0,027 \mu\text{g L}^{-1}$ og $0,130 \mu\text{g L}^{-1}$ i indløbsvand i henholdsvis september og december, begge gange i fire af seks stikprøver. Dette kunne tyde på utilsigtet kontaminering enten i forsøgene eller analyserne. Der blev dog ikke konstateret krydskontaminering.



FIGUR 9

GENNEMSNITLIGE KONCENTRATIONER \pm SE I INDLØBS- OG UDLØBSVAND AF DE TRE PESTICIDER I DELFORSØG 2. DE VANDRETTE STREGER PÅ Y-AKSEN ANGIVER DE NOMINELLE, TILSIGTEDE KONCENTRATIONER FOR KONTROL ($< 0,01 \mu\text{g L}^{-1}$), LAV OG HØJ KONCENTRATION.

3.2.2 Algevækst og nedbrydning af bladdetritus

Den gennemsnitlige mængde bentiske mikroalger på kakler var efter 7 uger (16. november) $0,65 \mu\text{g Kloro.} a \text{ cm}^{-2}$ ($\pm 0,66 \text{ SD}$), og efter 11 uger ved eksperimentets afslutning $0,90 \mu\text{g Kloro.} a \text{ cm}^{-2}$ ($\pm 0,96 \text{ SD}$). På sedimentet var klorofylmængden ved slut $0,44 \mu\text{g Kloro.} a \text{ cm}^{-2}$ ($\pm 0,18 \text{ SD}$).

Ved første indsamling af kaklerne var der ikke significant forskel i algemængde for de 15 behandlinger, men det var der ved forsøgets afslutning ($F_{14,30} = 2,32$; $P = 0,026$). Ved at teste for effekter af hvert af de tre pesticider særskilt (med varierende tæthed af de to andre pesticider) fandtes dog ingen effekter. Der var heller ingen signifikante forskelle i algemængde på sedimentet, hverken for de 15 behandlinger eller for pesticider enkeltvis.

Den gennemsnitlige nedbrydning af de tilsatte tørrede bøgeblade var efter 7 uger (16. november) $13,8 \%$ ($\pm 4,7 \text{ SD}$), og efter 11 uger (ved eksperimentets afslutning) $18,5 \%$ ($\pm 4,3 \text{ SD}$). Der var significant forskel på nedbrydning for de 15 behandlinger ved første indsamling ($F_{14,30} = 4,23$; $P < 0,001$), men ikke ved den sidste. Ved at teste for effekten af hvert af de tre pesticider særskilt (med varierende koncentration af de to andre pesticider) var der ved første optag en effekt af propiconazol ($F_{2,42} = 4,69$; $P = 0,015$) og pirimicarb ($F_{2,42} = 4,99$; $P = 0,011$), men hvor nedbrydningen overraskende steg med koncentrationen af begge disse stoffer. Der var ingen effekt af bentazon.

3.2.3 Ammonium, ferro-jern og uorganisk kulstof i sediment

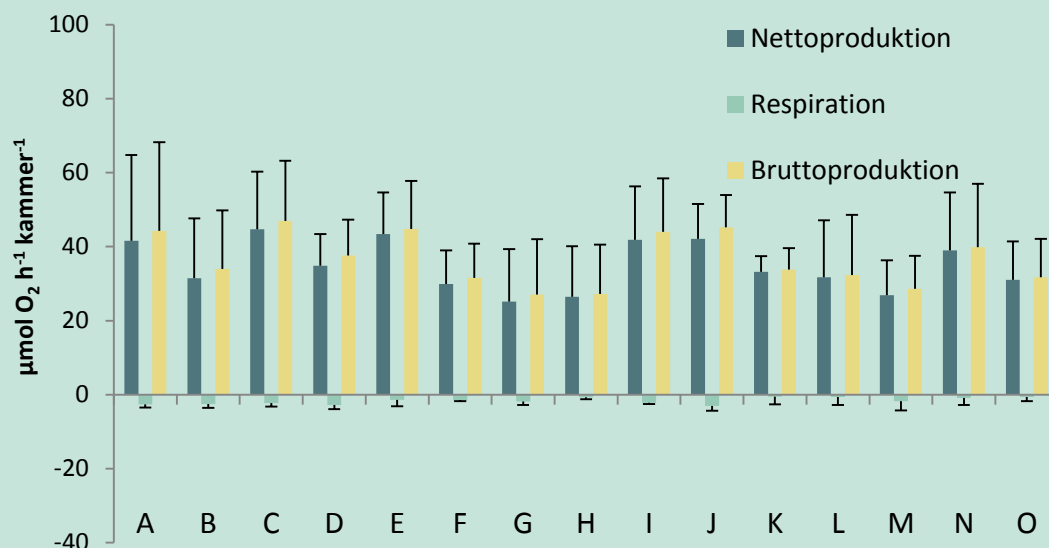
Koncentration af ammonium, ferrojern og opløst uorganisk kulstof (DIC) i sedimentets porevand blev målt ved eksperimentets begyndelse (31. august) og igen efter 11 uger, ved eksperimentets afslutning (16. december).

Den gennemsnitlige koncentration af ammonium var ved start $27,4 \mu\text{M}$ ($\pm 63,9 \text{ SD}$), og ved afslutning $9,4 \mu\text{M}$ ($\pm 3,6 \text{ SD}$), et signifikant fald ($t_{44} = 4,091$; $P < 0,001$). Den gennemsnitlige koncentration af ferrojern var ved start $68,6 \mu\text{M}$ ($\pm 72,0 \text{ SD}$), og ved afslutning $29,0 \mu\text{M}$ ($\pm 28,5 \text{ SD}$), et fald der dog ikke var signifikant. Den gennemsnitlige koncentration af DIC var ved start $2,60 \text{ mM}$ ($\pm 0,65 \text{ SD}$) og ved afslutning $2,00 \text{ mM}$ ($\pm 0,74 \text{ SD}$), et signifikant fald ($t_{44} = 6,865$; $P < 0,001$).

Der var ingen signifikante effekter af de 15 pesticidbehandlinger på forskellen i ammonium, ferrojern eller DIC, ej heller ved test for effekt af hvert af de tre pesticider særskilt (med varierende tæthed af de to andre pesticider).

3.2.4 Iltforbrug og produktion i kamre

Brutto iltproduktion, respiration og netto iltproduktion blev målt i hvert kammer umiddelbart før afslutningen af eksperimentet (Figur 10). Der var ingen effekt af pesticidbehandlingerne på de tre responsparametre, og dette gælder både ved sammenligning af de 15 behandlinger, og ved test på de tre forskellige niveauer af hvert enkelt stof hver for sig (med varierende koncentrationer af de andre 2 stoffer).



FIGUR 10

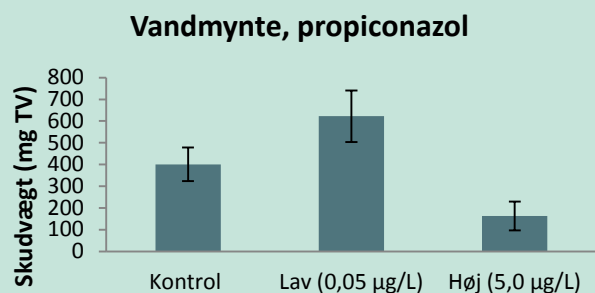
GENNEMSIT AF SAMLET ILTPRODUKTION (POSITIVE VÆRDIER) OG ILTFORBRUG (NEGATIVE VÆRDIER) \pm SE I MIKROKOSMOSKAMRE I DEL 2.

3.2.5 Morfologiske parametre og mortalitet hos planterne

I begyndelsen af september var mange ærenpris og mynte vokset højt ud af vandet og vandstjerne dannet flydende bladrossetter (Billede 2). Der blev på dette tidspunkt konstateret stedvist kraftig græsning fra billelarver på især ærenpris.

Dødeligheden blandt planterne under eksperimentet var lav for tykbladet ærenpris (2 %), men noget højere for vandmynte (9 %) og vandstjerne (13 %), dog uden at det var relateret til behandlingstype. Ved eksperimentets afslutning var de gennemsnitlige tørvægte af de høstede planter af ærenpris: 1412 mg (\pm 621 SD), mynte 579 mg (\pm 458 SD), og vandstjerne 176 mg (\pm 173 SD). Der var således meget stor variation indenfor arterne.

Der var ingen signifikante forskelle mellem de 15 pesticidbehandlinger på nogle af de morfologiske planteparametre. Testes effekten af hvert af de tre pesticider særskilt (med variende koncentration af de øvrige to pesticider) fandtes dog effekt af propiconazol på tørvægten af skud ($F_{2,38} = 5,69$; $P = 0,007$) hos vandmynte, der var højest ved lav koncentration og lavest ved den høje koncentration (Figur 11). Der blev ikke fundet signifikante effekter på ærenpris eller vandstjerne. I Tabel 5 opsummeres resultaterne fra deleksperiment 2.



FIGUR 11
GENNEMSIT (\pm SE) AF SKUDVÆGT HOS VANDMYNTE VED KONTROL OG TO KONCENTRATIONER AF PROPICONAZOL I DELEKSPERIMENT 2

TABEL 5
RESUMÉ AF RESULTATERNE FUNDET I DEL 2.

	Pesticideffekt	Bemærkning
Tykblandet ærenpris		
Skudantal	Ingen effekt	
Skudlængde	Ingen effekt	
Skudvægt	Ingen effekt	
Rodlængde	Ingen effekt	
Rodvægt	Ingen effekt	
Bladvægt:Rodvægt forhold	Overordnet	
Vandmynte		
Skudantal	Ingen effekt	
Skudlængde	Ingen effekt	
Skudvægt	Effekt af fungicid	Positiv effekt af lav koncentration
Rodlængde	Ingen effekt	
Rodvægt	Ingen effekt	
Bladvægt:Rodvægt forhold	Overordnet	Ingen effekt af enkeltstoffer
Vandstjerne sp.		
Skudantal	Ingen effekt	
Skudlængde	Ingen effekt	
Skudvægt	Ingen effekt	
Rodlængde	Ingen effekt	
Rodvægt	Ingen effekt	
Bladvægt:Rodvægt forhold	Ingen effekt	
Øvrige		
Mikrobiel omsætning af bladdetritus	Effekt af fungicid og insecticid	Størst nedbrydning ved høj konc.
Samlet iltforbrug mikrokosmos	Ingen effekt	
Samlet iltproduktion mikrokosmos	Ingen effekt	
Algevækst på kakler	Ingen effekt	
Algevækst på sedimenttoverflade	Ingen effekt	
Org. materiale i sediment (DIC)	Ingen effekt	Sign fald gennem eksperiment
Ammonium i sediment	Ingen effekt	Sign fald gennem eksperiment
Ferrojern i sediment	Ingen effekt	Sign fald gennem eksperiment

3.3 Planter og dyr i hydroponisk kultur (del 3)

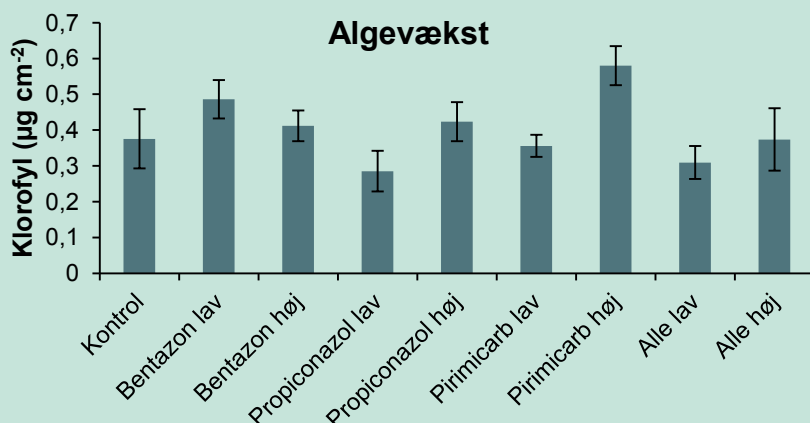
3.3.1 Pesticidkoncentrationer

For bentazons vedkommende var de målte koncentrationer i gennemsnit tæt på de nominelle (lav: 0,042 – 0,042; gens 0,042 $\mu\text{g L}^{-1}$) og (høj: 4,1 – 4,5; gens. 4,3 $\mu\text{g L}^{-1}$), mens de lå på ca. det halve for pirimicarb (lav: 0,018 – 0,021; gens 0,020) og (høj: 2,4 – 2,7; gens. 2,6 $\mu\text{g L}^{-1}$). Koncentrationen af den lave behandling af propiconazol (0,020 – 0,029; gens. 0,025 $\mu\text{g L}^{-1}$) var ligeledes kun det halve af den tilsigtede, mens den overraskende var under detektionsgrænsen ($< 0,01 \mu\text{g L}^{-1}$) for hvad der skulle have været ved den høje behandling (dette var dog kun baseret på to stikprøver, hvorfor vi ikke kan være sikre på at det har været et gennemgående problem). Der blev ikke fundet pesticider i stikprøver fra kontrolbehandlingerne, ej heller konstateret krydskontaminering.

3.3.2 Algevækst, nedbrydning af blad detritus og faunamortalitet

Faunaen udviste en generelt høj mortalitet i alle behandlinger – også i kontroller. For ferskvandstanglopper og flodnerit var hhv. 76 og 80 % af individerne døde efter 4 dage, og alle døde efter 11 dage. Hos vandbænkebidder var halvdelen døde efter 21 dage og alle var døde efter 48 dage. Den generelle overlevelse af faunaen var således så lav, at behandlingerne med og uden fauna puljes i de øvrige analyser af effekten af pesticidbehandlinger, som derfor testes med 10 replikater.

Den gennemsnitlige mængde bentske mikroalger på kakler var ved forsøgets afslutning 0,40 $\mu\text{g Klo. cm}^{-2}$ ($\pm 0,20$ SD). Der var significant forskel mellem de 9 behandlinger ($F_{8,81} = 2,85$; $P = 0,008$). Tukey's test viste at ingen behandlinger var forskellige fra kontrollen, men algebiomassen ved høj pirimicarb var signifikant højere end den med høj bentazon ($P = 0,008$) og højere end den med alle pesticider sammen i lav koncentration ($P = 0,036$) (Figur 12).

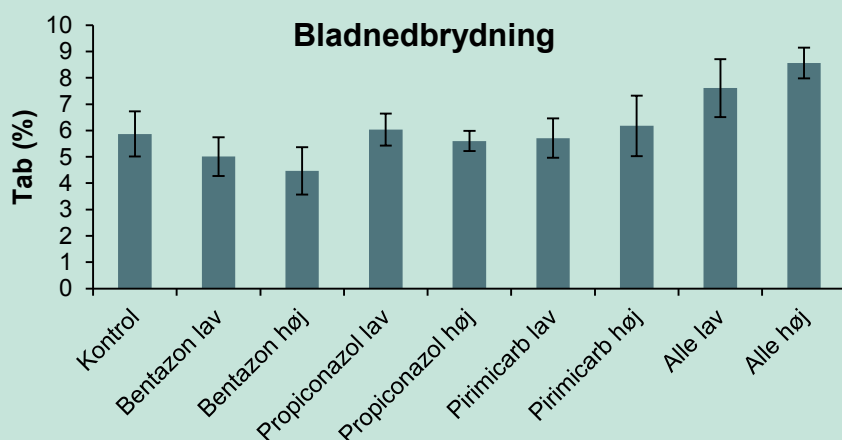


FIGUR 12

GENNEMSNIIT (\pm SE) AF ALGEVÆKST (KLOROFYL) PÅ KAKLER FOR DE 9 BEHANDLINGER I DELEKSPERIMENT 3

Den gennemsnitlige nedbrydning af de tilsatte tørrede bøgeblade var ved forsøgets afslutning 5,9 % ($\pm 3,0$ SD). Der var significant forskel mellem de 9 behandlinger ($F_{8,78} = 2,25$; $P = 0,032$). Tukey's test viste at ingen behandlinger var forskellige fra kontrollen, men nedbrydningen med alle

pesticider i høj koncentration var signifikant højere end den med høj bentazon ($P = 0,015$) (Figur 13).

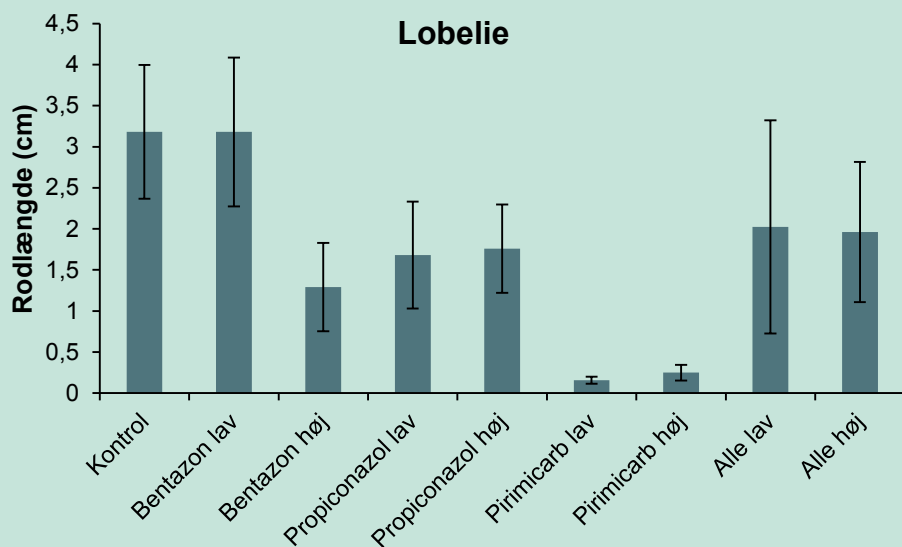


FIGUR 13

GENNEMSNIT (\pm S) AF NEDBRYDNING AF BØGEBLADE FOR DE 9 BEHANDLINGER I DELEKSPERIMENT 3

3.3.3 Morfologiske parametre og mortalitet hos planterne

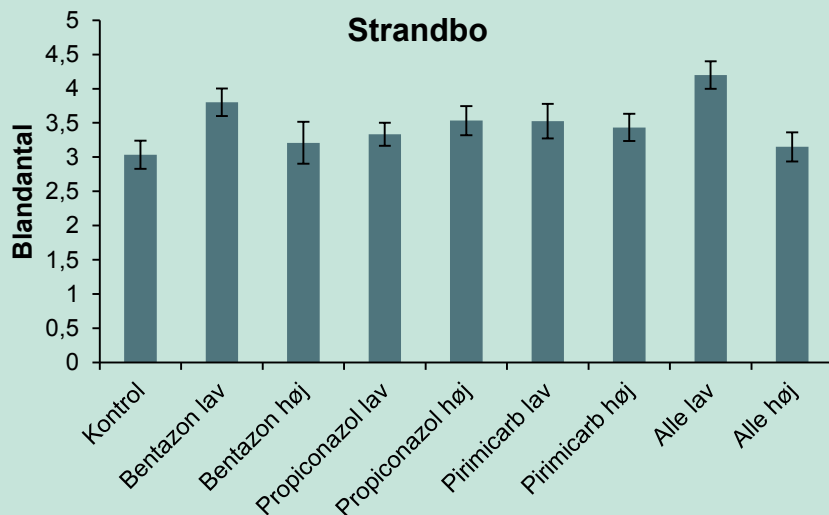
Dødeligheden blandt planterne under eksperimentet var lav for vandmynte (0 %) og strandbo (3 %), men noget højere for tykbladet ærenpris (12 %) og lobelie (11 %), dog uden at det var relateret til behandlingstype. Ved eksperimentets afslutning var de gennemsnitlige tørvægte af de høstede planter af ærenpris: 192 mg (\pm 1165 SD), mynte 218 mg (\pm 143 SD), strandbo 12,5 mg (\pm 4,8 SD), og lobelie 7,3 mg (\pm 7,0 SD). Der var således stor variation indenfor arterne. Der fandtes enkelte signifikante effekter af pesticidbehandlingerne på nogle af de morfologiske planteparametre. For lobelie var der signifikant effekt af behandlinger på længden af længste rod ($F_{8,70} = 2,70$; $P = 0,012$) og rod tørvægt ($F_{8,70} = 2,10$; $P = 0,048$). Tukey's test viste at behandlingen med lav og høj pirimicarb gav signifikant kortere rødder end ved kontrollen ($P = 0,026$) og lav koncentration af bentazon ($P = 0,027$) (Figur 14).



FIGUR 14

GENNEMSIT (\pm S) AF RODLÆNGDE HOS LOBELIE FOR DE 9 BEHANDLINGER I DELEKSPERIMENT 3

På strandbo var der generel behandlingseffekt på bladantallet ($F_{8,78} = 2,55$; $P = 0,016$). Tukey's test viste at behandlingen med alle tre pesticider i lav koncentration gav signifikant flere blade end ved kontrollen ($P = 0,016$) og alle 3 pesticider i høj koncentration ($P = 0,049$) (Figur 15).



FIGUR 15

GENNEMSIT (\pm S) AF BLADANTAL HOS STRANDBO FOR DE 9 BEHANDLINGER I DELEKSPERIMENT 3

En opsummering af resultaterne fundet i deleksperimet 3 fremgår af Tabel 6

TABEL 6

RESUMÉ AF RESULTATERNE FUNDET I DEL 3.

	Pesticideffekt	Bemærkning
<i>Tykblandet ærenpris</i>		
Skudlængde	Ingen effekt	
Skudvægt	Ingen effekt	
Rodlængde (Længste rod)	Ingen effekt	
Rodvægt	Ingen effekt	
Skudvægt:Rodvægt forhold	Ingen effekt	
<i>Vandmynte</i>		
Skudantal	Ingen effekt	
Skudlængde	Ingen effekt	
Skudvægt	Ingen effekt	
Rodlængde (Længste rod)	Ingen effekt	
Rodvægt	Ingen effekt	
Skudvægt:Rodvægt forhold	Ingen effekt	
<i>Strandbo</i>		
Bladantal	Overordnet	
Bladlængde	Ingen effekt	
Bladvægt	Ingen effekt	
Rodlængde (Længste rod)	Ingen effekt	
Rodvægt	Ingen effekt	
Bladvægt:Rodvægt forhold	Ingen effekt	
<i>Lobelie</i>		
Bladantal	Ingen effekt	
Bladlængde	Ingen effekt	
Bladvægt	Ingen effekt	
Rodlængde (Længste rod)	Overordnet, Insekticid	Negativ effekt
Rodvægt	Overordnet	
Bladvægt:Rodvægt forhold	Ingen effekt	
<i>Øvrige</i>		
Nedbrydning af bladdetritus	Overordnet, Fungicid	NB: Positiv effekt
Algevækst på kakler	Overordnet, Fungicid	NB: Neg effekt af lav koncentration

3.4 Interaktion: næring og pesticider (del 4)

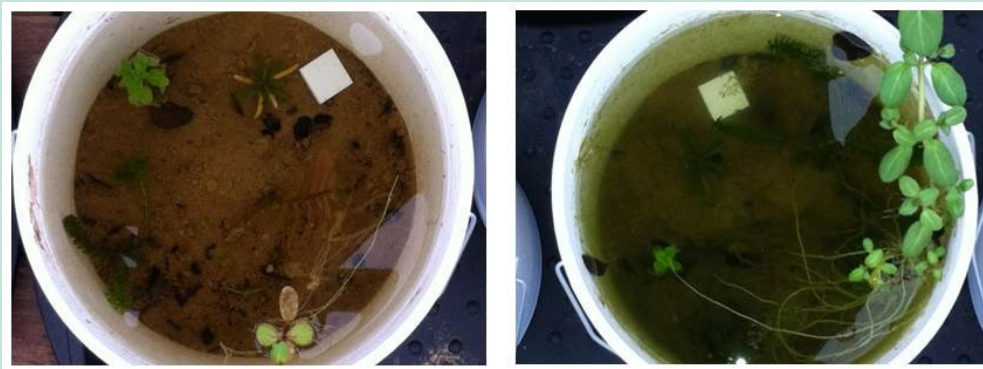
3.4.1 Pesticidkoncentrationer

Ved første udtagning (15. oktober) var de målte koncentrationer af bentazon i gennemsnit tæt på de nominelle (4,9 – 5,9; gens. 5,3 $\mu\text{g L}^{-1}$), mens de for propiconazol (igen) lå på ca. det halve (1,9 – 3,5; gens. 2,4 $\mu\text{g L}^{-1}$). Nogenlunde det samme blev fundet ved anden udtagning (20. november), to uger før forsøgets afslutning, (bentazon 4,0 – 4,4; gens. 4,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ og propiconazol 1,8 – 2,2; gens. 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Der blev på intet tidspunkt fundet pesticider i kontroller eller tegn på krydskontaminering.

3.4.2 Næringssaltkoncentrationer og vandkemi

Ved slutningen af eksperimentet (20. november) blev vandprøver til analyse af en række vandkemiske parametre udtaget. Alkalinitet og pH var henholdsvis $0,52 \text{ meq L}^{-1}$ ($\pm 0,16 \text{ SD}$) og $7,13$ ($\pm 0,43 \text{ SD}$), og der var ikke systematisk forskel mellem behandlinger.

Koncentrationen af total-N var $6,42 \text{ mg L}^{-1}$ ($\pm 2,63 \text{ SD}$) i de berigede spande, og $0,22 \text{ mg L}^{-1}$ ($\pm 0,08 \text{ SD}$) i spande uden gødningsspillere. Helt så markant en forskel var der ikke for total-P, hvor koncentrationen var $88 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ($\pm 57 \text{ SD}$) i de berigede spande, mod $16 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ($\pm 17 \text{ SD}$) i spande uden tilsat næring, men altså med ganske stor intern variation i de to grupper af spande. Disse forskelle i næringssaltkoncentration kunne tydeligt ses på mikrokosmossamfundene (Billede 7)



BILLEDE 7

TYDELIG FORSKEL PÅ NÆRINGSFATTIG BEHANDLING (TIL VENSTRE) OG NÆRINGSBERIGET BEHANDLING (TIL HØJRE) I DEL 4.

3.4.3 Algevækst på kakler

Den gennemsnitlige mængde benthiske mikroalger på kakler var ved forsøgets afslutning $1,35 \text{ } \mu\text{g Klo. } a \text{ cm}^{-2}$ ($\pm 1,18 \text{ SD}$) i spande med høj næring, og $0,21 \text{ } \mu\text{g Klo. } a \text{ cm}^{-2}$ ($\pm 0,07 \text{ SD}$) i spande med lav næring. Næringseffekten var signifikant ($F_{1,47} = 66,27$; $P < 0,001$). Der ikke var nogen effekt af pesticidbehandling ($F_{3,47} = 1,09$; $P = 0,365$), heller ikke ved høj næring ($F_{3,23} = 2,61$; $P = 0,080$). Der var dog en effekt af pesticidbehandlingen på responset på næringsniveauet (interaktionseffek, $F_{3,47} = 4,41$; $P = 0,009$), idet forskellen i klorofylkoncentration mellem lav og høj næring var konsekvent (og markant) mindre ved tilstedeværelse af de to pesticider, både hver for sig og sammen (Tabel 7).

TABEL 7

KONCENTRATION AF KLOROFYL A ($\mu\text{G CM}^{-2}$) PÅ KAKLER I DEL 4.

Behandling	Lav næring	Signifikans niveau	Høj næring	Forhold høj:lav
Kontrol (uden pesticid)	0,15	<0,001	2,31	15,4
Propiconazol (fungicid)	0,24	<0,05	1,34	5,6
Bentazon (herbicid)	0,25	<0,05	0,82	3,3
Propiconazol + Bentazon	0,21	<0,05	0,95	4,5
Total	0,21	<0,001	1,35	6,4

3.4.4 Morfologiske parametre og mortalitet hos planterne

Der var ingen dødelighed hos vandpest, strandbo og lobelie. Derimod var den anseelig hos tykbladet ærenpris og kruset vandaks, mens næsten alle individer af vandmynte døde under forsøget. Data for de tre sidstnævnte arter er således for spinkel til komplet resultatanalyse (vandmynte udgår helt). Dødeligheden var generelt en smule højere ved høj næringsniveau, men var ikke relateret til pesticidbehandling.

Også for så vidt angår vækst var der meget stor forskel på hvor godt planterne klarede sig under eksperimentet (Tabel 8). Ærenpris var typisk den art der kom til at dominere, og voksede langt op af de fleste spande, i andre tilfælde overtog vandpest helt biomassen under vandet, mens fx. lobelie generelt klarede sig dårligt og havde negativ vækst.

TABEL 8
GENNEMSNITSVÆRDIER FOR VÅDVAGT, VÆKSTRATE OG DØDELIGHED HOS DE 6 PLANTEARTER I DELEKSPERIMENT 4.

	Vådvægt (g)				Vækstrate (d ⁻¹)		Dødelighed	
	Start		Slut					
	Gens.	SD	Gens.	SD	Gens.	SD	Planter	%
Vandpest	0,781	0,226	2,279	1,515	0,009	0,005	0	0
Strandbo	0,282	0,130	0,325	0,159	0,001	0,004	0	0
Lobelie	1,826	0,882	0,970	0,484	-0,006	0,003	0	0
Ærenpris	0,832	0,311	7,252	10,862	0,015	0,011	13	27
Vandaks	0,167	0,086	0,277	0,266	0,006	0,006	11	23
Mynte	0,731	0,198	0,033	0,087	-0,012	0,002	41	85

Den samlede biomasse af planter per spand var signifikant større ved høj (30,79 gVV ±23,47 SD) end ved lav næring (7,61 gVV ±2,25 SD) ($F_{1,47} = 27,44$; $P < 0,001$). Der var dog ingen effekt på samlet biomasse af pesticidbehandlinger eller interaktion med næringsniveau.

Der var signifikant positiv effekt af næringsstofberigelse på vækstrater hos vandpest ($F_{1,47} = 21,17$; $P < 0,001$), ærenpris ($F_{1,33} = 7,36$; $P < 0,001$) og strandbo ($F_{1,47} = 14,95$; $P < 0,001$), men ikke hos vandaks og lobelie (Tabel 9). Der var også positiv effekt af næringsstofberigelse på skud:rodvægtsforhold hos vandpest ($F_{1,47} = 14,14$; $P < 0,001$), strandbo ($F_{1,47} = 20,25$; $P < 0,001$) og lobelie ($F_{1,47} = 6,44$; $P = 0,015$).

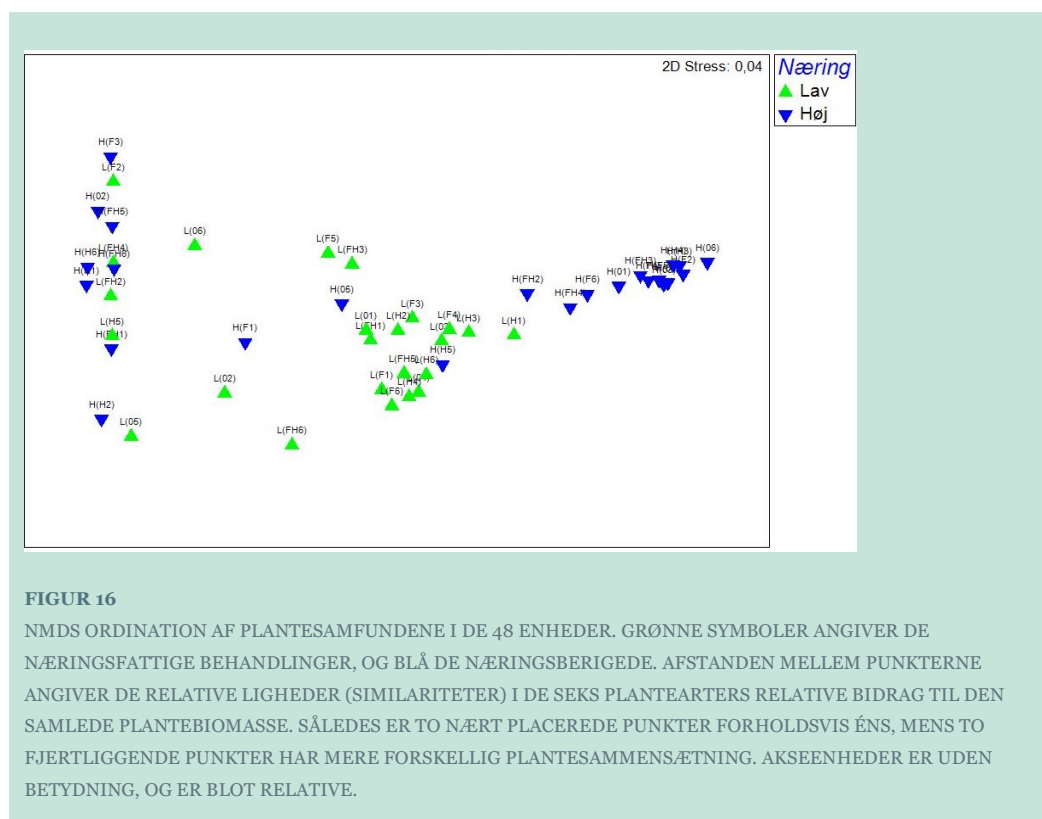
Der var tillige effekt af pesticidbehandlingerne ved høj næring på skud:rodvægtsforholdet hos lobelie ($F_{3,47} = 4,26$; $P = 0,011$), som var lavere ved behandlingerne med propiconazol samt propiconazol & bentazon.

TABEL 9

GENNEMSNITLIGE VÆKSTRATER (d^{-1}) VED DE 4 PESTICIDBEHANDLINGER MED LAV OG HØJ NÆRINGSKONCENTRATION I DELEKSPERIMENT 4.

	Lav næring				Høj næring			
	Kontrol	Fung.	Herb.	Fung. & Herb.	Kontrol	Fung.	Herb.	Fung. & Herb.
<i>Vandpest</i>	0,007	0,008	0,005	0,006	0,011	0,016	0,010	0,010
<i>Strandbo</i>	-0,001	-0,002	0,001	0,001	0,003	0,004	0,002	0,004
<i>Lobelia</i>	-0,006	-0,007	-0,006	-0,007	-0,004	-0,005	-0,006	-0,006
<i>Ærenpris</i>	0,004	0,009	0,008	0,008	0,024	0,025	0,026	0,025
<i>Vandaks</i>	0,006	0,009	0,002	0,004	0,004	0,011	0,002	0,003

Et NMDS ordinationsplot (Non-metric Multi-Dimensional Scaling) baseret på Bray-Curtis similariteter af standardiserede slut-vådvægte (for at fjerne effekten af den systematisk højere samlede biomasse ved høj næringssaltniveau) viser ligheder mellem samfundenes sammensætning (relative fordeling af biomasse på de 6 plantearter) i spandene (Figur 16). ANOSIM analyser (Analysis of Similarity) tester om variationen i artsfordeling mellem samfund (her enkeltspande) imellem på forhånd definerede grupper (her fx høj versus lav næringstilførsel) er større end indenfor disse grupper. Der var significant forskel på samfundene ved de to næringsniveauer (Global R = 0,232; P = 0,001), men ikke for de forskellige pesticidbehandlinger, hverken ved lav (Global R = -0,012; P = 0,491) eller ved høj næring (Global R = -0,011; P = 0,491). De blå trekanter til højre på diagrammet er spande domineret af ærenpris, mens de blå trekanter til venstre er spande uden dominans af ærenpris, men typisk domineret af vandpest. Resultaterne for del 4 er opsummeret i Tabel 10.



TABEL 10

RESUMÉ AF RESULTATERNE FUNDET I DEL 4. NA = IKKE ANALYSERET.

	Næringseffekt	Pesticideffekt	Interaktion	Bemærkning
Plantesamfund				
Samlet biomasse	Ja	Nej	Nej	
Samfundsstruktur	Ja	Nej	na	
Vandpest				
Vækstrate	Ja	Nej	Nej	
Skudvægt:rodvægt forhold	Ja	Nej	Nej	Høj næring positiv effekt
Kruset vandaks				
Vækstrate	Nej	na	na	
Skudvægt:rodvægt forhold	Nej	na	na	
Tykbladet ærenpris				
Vækstrate	Ja	na	na	
Skudvægt:rodvægt forhold	Nej	na	na	
Strandbo				
Vækstrate	Ja	Nej	Nej	
Skudvægt:rodvægt forhold	Ja	Nej	Nej	Høj næring positiv effekt
Lobelia				
Vækstrate	Nej	Nej	Nej	
Skudvægt:rodvægt forhold	Ja	Ja	Nej	Høj næring positiv effekt
Øvrige				
Algevækst på kakler	Ja	Nej	Ja	

4. Diskussion

4.1 Grundskudsplanter og smådyr fra sø (del 1)

Formålet med dette deleksperiment var at undersøge effekter af langtidseksponering over for pesticider på vækst og stofomsætning i samfund af grundskudsplanter og udvalgte arter af smådyr fra en næringsfattig sø. Vi forventede stor følsomhed hos disse undervandsplanter, der vokser langsomt og er afhængige af rod-symbiose med mykorrhiza-svampe for at kunne skaffe sig næringsstoffer, især fosfat (Møller & Sand-Jensen 2013). Eksperimentet byggede på naturlige plantesamfund, hjemtaget i uforstyrrede sedimenter-tørv, og forløb over 6 måneder. Vi ved at brugen af uforstyrrede sedimenter i eksperimenter med naturlige plantesamfund er vigtig for at undgå stress og øget mortalitet af planterne. Ved udplantning er planterne nødt til at producere et nyt rodnet, hvilket er særlig ”ressourcekrævende”, når rodnettet er stort og planterne skal bruge det til at optage kulddioxid til fotosyntesen, som tilfældet er for grundskudsplanterne. Vi ved også, at lange forsøgstider er nødvendige, da planterne vokser langsomt og det derfor kræver lang tid, før vi kan se eventuelle effekter.

Der blev målt mange responsparametre på både organisme- og økosystemniveau. Variationen i flere af de studerede responsparametre var betydelig, og dette forhold i kombination med det relativt lave antal af replikater per behandling ($n = 3$) gjorde det vanskeligt at vurdere effekter af de tre pesticider, særligt kombinationseffekter. Der var imidlertid signifikant effekt af de 15 pesticidbehandlinger på slutkoncentrationen af ammonium og DIC i sedimentet, men ingen effekt af hvert af de tre pesticider testet særskilt. Det er kendt fra tidligere studier (Sand-Jensen *et al.* 2005, Møller & Sand-Jensen 2012), at reduktion af iltudskillelsen fra rødderne hos grundskudsplanter, som følge af hæmning af fotosyntesen og/eller reduktion af rodnettet, meget hurtigt giver anledning til ophobning af ammonium og reduceret jern (ferrojern). Behandlingerne med pesticider påvirkede dog ikke fotosyntesen (i højere grad end i kontroller), og vi har således ingen forklaring på pesticideffekten på slutkoncentrationen af ammonium. Det er også kendt, at den samlede sedimentnedbrydning kan vurderes vha. måling af indholdet af uorganisk kulstof i sedimentet og ved respirationen i mørke, som giver anledning til iltforbrug eller CO₂ frigivelse. Men heller ikke her konstaterede vi signifikante pesticideffekter.

Parallele studier har vist, at vi nok generelt har overvurderet følsomheden for fysiologiske stress hos grundskudsplanter. Det har faktisk vist sig, at deres lave stofskifte og vækst gør dem mindre følsomme for eksempelvis iltvind end hurtigere voksende planter som fx ålegræs (Pulido & Borum 2006, Sand-Jensen, unpublicerede data). Iltfrie forhold dræber således ålegræs på 1 døgn, mens tvepibet lobelie overlever 5 døgn. Derimod er reaktioner overfor eutrofiering fortsat voldsomme hos grundskudsplanterne (Sand-Jensen *et al.* 2005).

Nedbrydning af bladpladerne i mikrokosmos var hverken påvirket af behandling eller posetype, hvilket betyder at ituriverne ikke har bidraget nævneværdigt til nedbrydning af blade i mikrokosmoskamrene, formentlig pga. en for lav tæthed af dyr, og en for høj tilstedeværelse af andre, mere attraktive fødeemner. Vi vurderer derimod ikke at det skyldes dødeligheden hos smådyrene, idet en betragtelig andel af disse overlevede i stor dele af den periode bladnedbrydningen blev fulgt. Alt i alt kan vi ikke påvise nogle utvetydige effekter af pesticiderne i dette deleksperiment.

4.2 Amfibiske planter fra vandløb (del 2)

Formålet og den eksperimentelle opstilling i dette deleksperiment var den samme som i del 1, blot med den forskel, at del 2 undersøgte samfund af amfibiske/akvatiske planter fra vandløb. Forventningen var, at planterne ville være relativt robuste over for pesticiderne, fordi de dels er i stand til at vokse ud af vandet (og dermed er eksponerede for pesticiderne på en mindre overflade), dels ikke er afhængige af rod-symbiose med mykorrhiza-svampe. På den anden side kunne vi forvente, at hurtigt voksende planters vækst og overlevelse påvirkes kraftigere af det fysiologiske stress, som pesticider kan udløse, hvis den betydelige følsomhed, der er påvist over for iltvind hos ålegræs (Pulido & Borum 2006), også eksisterer hos andre hurtigtvoksende planter, så som de amfibiske arter/vandskudsplanter som vi har undersøgt.

Den eneste signifikante effekt på de amfibiske planter i dette eksperiment var, at lav koncentration af propiconazol stimulerede skudvægten hos vandmynte, mens en høj koncentration virkede hæmmende. Det er velkendt, at lave koncentrationer af stressende stoffer kan stimulere aktiviteten hos de påvirkede organismer, en såkaldt *hormetisk* effekt (Stebbing 1982). Der er meget, der tyder på, at sådanne resultater ikke blot skyldes et eksperimentelt artefakt eller omfordeling af ressourcer internt i planten. Det er heller ikke alle pesticider der forårsager hormesis, så der er næppe tale om en universel og triviel stressrespons (Cedergreen 2008). Effekten afhænger iøvrigt af den undersøgte responsparameter, hvor en af de mest følsomme er længdevækst, mens vækstraten for tørvægt er mindre tydelig (Cedergreen *et al.* 2007). Det kunne tyde på en hormonal effekt, da strækningsvækst er kendt for at være kraftigt hormonalt styret. Vi fandt en positiv effekt af lave koncentrationer af propiconazol på skudvægten hos de amfibiske planter. Tebuconazol, som er et andet triazol (ligesom propiconazol), er godkendt som vækstregulerende middel (ud over som fungicid) (Efsa 2014). Muligvis har propiconazol samme virkning i lave doser.

Der var significant effekt på bladnedbrydning af de 15 pesticidbehandlinger ved første indsamling, hvilket skyldtes en effekt af propiconazol og pirimicarb, men nedbrydningen steg overraskende med koncentrationen af begge disse stoffer. Særligt for fungicidet propiconazol var forventningen, at stoffet ville have en hæmmende effekt på den mikrobielle bladnedbrydning (se nedenfor).

4.3 Planter og dyr i hydroponisk kultur (del 3)

Dette eksperiment blev udført med henblik at undgå sorption af pesticiderne til sedimenter, og for at undersøge om den manglende effekt af pesticider i del 1 og 2 kunne skyldes en evt. naturlig

afgiftende effekt af det mineralske og/eller organiske sediment. I dette eksperiment blev der ikke etableret gennemstrømning, men istedet blev der foretaget hyppige vandudskiftning med nominel koncentration af de ønskede pesticidbehandlinger med henblik på at "mætte" de eksperimentelle spandes overflader og derved sikre, at koncentrationen af pesticider i vandet ikke blev kunstigt reduceret, fordi de var blevet adsorberet på overfladerne. Analysen af propiconazol i hvad der skulle have været den høje behandling var under detektionsgrænsen. Dette er meget svært at forklare, og da det kun er baseret på to stikprøver kan vi ikke vide om behandlingerne generelt har været fejlbehæftede; det er svært at tro. Dette besynderlige resultat kan også skyldes en mærknings- eller skrivefejl et sted i processen med prøveudtag, forsendelse og analyse.

Faunaen udviste en generelt høj mortalitet i alle behandlinger – også i kontrollerne. Det må være relateret til forsøgsbetingelserne, men vi har vi ingen plausible forklaringer på det, og har således ikke præsenteret resultaterne. Det betød imidlertid, at vi så bort fra, om der var dyr til stede eller ikke og puljede de øvrige analyser af effekten af pesticidbehandlinger, som derfor kunne testes med 10 replikater.

Der blev fundet enkelte signifikante effekter af pesticidbehandlingerne på nogle af de morfologiske planteparametre. For tvepibet lobelie var der en negativ effekt af pirimicarb på rodlængden og på rod-tørvægten. Imidlertid er vi ikke bekendt med at insekticider skulle kunne påvirke disse parametre. På strandbo var der en generel behandlingseffekt på bladantallet, og en stimulerende effekt af lave pesticidkoncentrationer, særligt bentazon, altså igen et tegn på hormesis. Vi kender ikke til studier der har påvist hormetisk effekt af bentazon, men lave koncentrationer (typisk $< 1 \mu\text{g L}^{-1}$) af mange herbicider er kendt for at kunne stimulere alge- og plantevækst (Cedergreen *et al.* 2007; Cedergreen 2008).

For så vidt angår vækst af mikroalger på kakler og nedbrydning af bøgeblade var der ingen signifikante forskelle mellem nogen af behandlingerne og kontroller. Imidlertid var der enkelte forskelle mellem behandlingerne indbyrdes, hvilket antyder at sammenhængen mellem effekter af forskellige pesticider i forskellige koncentrationer kunne være særdeles komplekse. Vi kan på baggrund af denne undersøgelse ikke forklare disse sammenhænge, og idet vi i tilgift anser muligheden for at resultaterne skyldes tilfældigheder, vil vi ikke fortolke yderligere.

De få/manglende effekter af pesticiderne bekræftede altså de tidligere eksperimenter i de sedimentfyldte mikrokosmos i del 1 og 2. Vi konkluderer derfor, at de manglende effekter *ikke* skyldes en afgiftende effekt af sedimentet. Det indebærer på den anden side, at de få og små, og sædvanligvis manglende, effekter af pesticiderne på de undersøgte organismer (planter og dyr), processer og økologiske systemer er reelle.

4.4 Interaktion: næring og pesticider (del 4)

Dette deleksperiment blev udført med henblik på at undersøge en eventuel interaktion mellem effekten af næringssaltberigelse og af herbicid/fungicid på overlevelse, vækst og udvikling af etablerede samfund af grundskuds-, vandskuds- og amfibiske planter. Man kunne forvente at

pesticider ville påvirke de hurtigtvoksende planter mulighed for at udnytte god næringstilgang, og samtidig ville øge stresset af eutrofiering på de langsomme grundskudsplanter.

Både algevækst og plantevækst reagerede som forventet kraftigt på tilsætning af ekstra næring, men der var stort set ingen målbar effekt af behandlingerne med bentazon og propiconazol, der i dette eksperiment begge blev tilført i høj koncentration ($5,0 \mu\text{g L}^{-1}$). Imidlertid var der visse tegn på en interaktionseffekt af pesticider på responset til næringssaltberigelse. Der var ingen effekt på vækst af alger af pesticidbehandling i sig selv, men derimod på responset ved næringsberigelsen, idet tilstedeværelsen af både propiconazol og bentazon hæmmede dette respons. Ligeledes hæmmede behandlingerne med propiconazol samt propiconazol+bentazon skud:rodvægtsforholdet hos tvepibet lobelie, men kun ved høj næring.

Næringsberigelse øgede succesen hos de hurtigtvoksende amfibiske planter og vandskudsplanterne, men hæmmede de langsomtvoksende grundskudsplanternes udvikling yderligere. Variation i tilgængelighed af næringsstoffer gav derfor anledning til markant større forandringer end de generelt ikke målbare effekter ved tilsætning af pesticider. Resultatet er vigtigt, fordi det understreger, at de undersøgte biologiske systemer giver anledning til markante respons, når der foreligger en reel kraftig påvirkning. Pesticiderne i de anvendte miljørealistiske koncentrationer tilhører ikke denne kategori, mens næringsstofferne gør. Vi har altså ikke valgt biologiske systemer, som generelt er upåvirkelige, tværtimod.

4.5 Overordnet vurdering af de anvendte pesticiders effekter

Bentazon havde kun i ganske få tilfælde effekt. I et enkelt tilfælde var der en hormetisk effekt på bladantallet hos strandbo, og i kombination med propiconazol en interaktionseffekt med næringssaltniveau på væksten af alger og skud:rodvægtsforhold hos tvepibet lobelie.

Vi kender ikke til studier der specifikt har påvist hormetisk effekt af bentazon. Få herbicider er toksiske for alger og vandplanter ved koncentrationer $< 1 \mu\text{g L}^{-1}$ (EC_{50}), og medianværdien for effekter på fotosystem II inhibitorer som bentazon er $100 \mu\text{g L}^{-1}$, (EC_{50}) (Cedergreen & Streibig 2005). Ejrnæs et al. (2014) fandt $\text{EC}_{50} = 2,56 \text{ mg L}^{-1}$ for ferskvandsplanten liden andemad (*Lemna minor*). Nielsen & Dahllöf (2007) fandt, at en koncentration på $240 \mu\text{g L}^{-1}$ ingen effekt havde på tilvæksten hos ålegræs (*Zostera marina*), og der skulle $24 \mu\text{g L}^{-1}$ til før en effekt på klorofylindholdet kunne måles. Macedo et al. (2008) undersøgte bentazons effekt på den marine kiselalge *Skeletonema costatum* og fandt $\text{EC}_{50} = 13 \text{ mg L}^{-1}$ bestemt ved PAM malinger, og $\text{EC}_{50} = 24 \text{ mg L}^{-1}$ på basis af væksteksperimenter (hvilket iøvrigt understreger PAM metodikkens høje følsomhed). Men her drejer det sig om effekter, der først optræder ved meget, meget højere koncentration end dem, vi anvendte.

Bentazon synes således at være et af de mindst toksiske herbicider for "non-target" akvatiske mikroalger og vandplanter (Cedergreen & Streibig 2005). Derfor forekommer effektkoncentrationer af bentazon på akvatiske organismer at være væsentlig højere end de "miljørealistiske niveauer", vi anvendte. På baggrund af denne sammenligning er det på trods af den lange eksponeringstid

forventeligt, at vi stort set ikke fandt specifikke effekter af bentazon på hverken alger eller vandplanter.

Propiconazol var det stof, der viste de fleste effekter. Det var ganske vist ingen effekt på hverken udviklingen af mykorrhiza i del 1, eller bladnedbrydning i del 1 og 3, mens der faktisk var positiv effekt på bladnedbrydning i del 2. Den fraværende hæmning af den mikrobielle nedbrydning af blade (der i ferskvand generelt varetages af svampe) var umiddelbart overraskende, fordi et fungicid burde hæmme nedbrydningen via svampe. Rasmussen *et al.* (2012a) fandt, at bølgeblade der havde været udsat for kortvarige, men høje koncentrationer af propiconazol ($50 - 500 \mu\text{g L}^{-1}$) efterfølgende havde signifikant nedsat mikrobiel nedbrydning. Imidlertid er så høje koncentrationer næppe relevante for så vidt angår mere permanente belastninger, og den manglende effekt i vores studium skyldes formentlig de lave, men mere miljørealistiske koncentrationer. Imidlertid er det blevet påvist ved feltundersøgelser, at den samlede effekt af tilstedeværende blandinger af flere forskellige fungicider og insekticider har en effekt på omsætningshastigheder af blade (Rasmussen *et al.* 2012b).

Studier på terrestrisk jord fandt ingen effekt af $0,25 \mu\text{g propiconazol g}^{-1}$ jord på hyfetæthed, fosfatoptagelse eller succinate dehydrogenase aktivitet hos tre *Glomus*-arter, der laver arbuskulær mykorrhiza (Kling og Jakobsen 1997). Kjølner og Rosendahl (2000) påviste effekter af propiconazol på phosphataseaktivitet i ekstern mykorrhiza, men i noget højere doser ($0,21 \mu\text{g g}^{-1}$ jord) end dem der blev anvendt i vores studium, men fandt slet ingen effekt af selv 100 gange højere doser på intern aktivitet. Calonne *et al.* (2010) undersøgte effekten af propiconazol på en række responsparametre (fx. spiring af sporer, rodkolonisering, hyfelængde, phosphatidylcholin indhold) for den arbuskulære mykorrhiza svamp *Glomus irregulare* på cikorie-rødder holdt i vækstmedium i petriskåle, og fandt absolut ingen effekter før en koncentration på $200 \mu\text{g L}^{-1}$. Vores undersøgelse er tilsyneladende den første af propiconazols effekt på akvatisk mykorrhiza, men det er på denne baggrund ikke overraskende, at vi ikke har fundet klare effekter af stoffet i de lave, men formodet miljørealistiske koncentrationer, vi har arbejdet med.

Pirimicarb havde ingen effekter på de tre anvendte arter af smådyr, hverken i del 1, del 3 eller i eksperimentet i petriskåle, selv ved koncentrationer på $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$, hvilket tyder på at stoffet i sig selv har en lav toxicitet. Der er tilsyneladende ikke lavet mange studier af dette stofs langtidseffekter på akvatiske invertebrater, men Møhlenberg *et al.* (2004) fandt at eksponering til så høje koncentrationer som 5 mg L^{-1} ingen toksicitet havde hos 5 forskellige arter af makroinvertebrater (deriblandt *Gammarus pulex*) fra vandløb, selv efter 14 dage. Disse resultater bekræftes af Rasmussen *et al.* (2014). I modsætning hertil står, at kortidseksponeringer ($0,5 - 8 \text{ t}$) på $40 \mu\text{g L}^{-1}$ medførte nedsat mobilitet og øget dødelighed, og eksponeringer på $100 \mu\text{g L}^{-1}$ fremkaldte nedsat vækst og fekunditet hos dafnien *Daphnia magna* (Andersen *et al.* 2006).

Blandingseffekter ("cocktaileffekter") er blevet undersøgt og påvist for en del organismer og for en række kombinationer af pesticider, dels indenfor grupperne af herbicider, fungicider og insekticider, og dels mellem disse grupper af forskellige virkemåder (e.g. Munkegaard *et al.* 2008; Relyea 2009; Verbruggen & Van den Brink 2010; Nørgaard & Cedergreen 2009). Studier af stofferne anvendt i denne undersøgelse er vi imidlertid ikke bekendte med. Vi må konstatere, at vi har fundet sådanne (effekter af blandinger på DIC og ammonium i sedimentet i del 1; blad:rodvægt

hos ærenpris og vandmynte i del 2; en del effekter på bladnedbrydning, algevækst, bladantal hos strandbo og rodlængde hos tvepibet lobelie i del 3; og et enkelt tilfælde på skud:rodvægt hos tvepibet lobelie i del 4). Som tidligere nævnt er flere af disse effekter svære at forklare, og vi kan ikke afgøre om der kunne være tale om egentlige synergistiske effekter, eventuelt ved højere koncentrationer.

4.6 Tværgående vurdering af eksperimenter og resultater

Vel vidende at de tidligere fundne effektkoncentrationer af de anvendte pesticider ligger væsentligt højere end de mere "miljørealistiske" koncentrationer vi har anvendt her, kan man spørge, hvorfor vi da overhovedet har forventet at kunne dokumentere effekter. Her er det helt centralt for projektets idé, at eksperimenterne har forløbet over lang tid (4-6 måneder); man kunne altså forvente effekter af lave koncentrationer over lange eksponeringstider. Desuden udmærker projektet sig ved ikke blot at have undersøgt organismerespons, men også inddraget parametre på økosystemniveau (fx samlet produktion/respiration, sedimentkoncentrationer af DIC og fyto-toxiner, samlet plantebiomasse og sammensætning). Over tid kan eventuel påvirkning af økosystem parametre nemlig dreje det i en ny retning og frem til en ny situation.

Vores resultater viser samstemmende, at der med få undtagelser ikke var signifikante effekter af de anvendte pesticider på de responsparametre, vi undersøgte. Det er vigtigt at understrege, at vi undersøgte **mange** økologisk relevante responsparametre for såvel overlevelse, morfologi og aktivitet hos planter, dyr, svampe og samlede mikrobielle samfund under forskellige eksperimentelle betingelser. Analysen dækker således både forventet meget følsomme parametre som planters fotosynteseaktivitet (elektrontransport målt som PAM i fotosystem II), fotosyntesekapacitet (iltproduktion) og sedimentkemi, og på kort sigt mindre følsomme parametre (pga stor variation mellem individer) såsom overlevelse og størrelse, samt vægt af blade og rødder. Sidstnævnte parametre bør dog også reagere i tilfælde af negative effekter over den lange forsøgstid, vi har anvendt, og særligt rodlængde har vist sig at være en følsom responsparameter ("endpoint") i i øko-toxikologi-tests af herbicider på vandplanter (Arts *et al.* 2008). Rodlængden bliver også voldsomt forkortet, hvis grundskudsplanter iltfrigivelse til sedimentet reduceres ved hæmning af deres fotosyntese, eller hvis det potentielle iltforbrug i sedimentet øges – eksempelvis ved tilsætning af omsætteligt organisk stof (Møller & Sand-Jensen 2008, 2012). Det er slående, at ingen af de mange forskellige parametre og fysiologiske og økologiske niveauer vi studerede, gav anledning til signifikante negative effekter af de tilsatte pesticider ved de miljørealistiske koncentrationer, ikke engang ved 5 µg/L som er væsentlig over hvad der er miljørealistisk, i hvert fald som længereværende eller kronisk påvirkning.

Man kan derfor spørge, er der er noget i forsøgsdesignet, som har givet en kunstig lav følsomhed i vores analyse? Svaret har både et forsøgspraktisk og statistisk element. De store forsøgskamre, anvendelse af uforstyrrede plantetørv (i del 1) med naturligt sediment, fortsat vandudskiftning og den lange forsøgstid er optimale for at opnå en økologisk relevant vurdering af de tilsatte stoffer. Hvor planterne blev omplantet (del 2, 3 og 4) anvendte vi en lang akklimatiseringsperiode inden forsøget begyndte med pesticidtilsætning. Omvendt må vi konstatere, at plantedødeligheden var anseelig i alle fire deleksperimenter, selvom pesticiderne ingen signifikante effekter havde på

dødelighed, som forekom i både kontroller og pesticidbehandlingerne. Imidlertid er dødeligheden dog et udtryk for at mange af planterne, særligt nogle arter i nogle deleksperimenter, ikke har haft optimale vækstbetingelserne. Vi kan således ikke afvise at effekten af pesticiderne har været maskeret på de svage planter, og at den havde været anderledes på sunde og voksende planter, men det er svært at sige til hvilken side. En relativ større effekt på sunde planter kunne forventes hvis væksten reduceres af pesticiderne, mens en større effekt også kan tænkes på i forvejen svage planter. Det er dog vigtigt at understrege at også i naturen er der perioder og habitater hvor nogle planterarter vokser bedre end andre, og naturlig mortalitet kan være betydelig, men er sjældent undersøgt bortset fra hos kimplanter og planter efter kimplante-stadiet.

Størrelsesordenen af de målte pesticidkoncentrationer i eksperimenterne fulgte generelt de tilsigtede, omend de målte, i både indløbs- og udløbsvandet (del 1 og 2), typisk var noget lavere end de nominelle. For så vidt angår indløbsvandet, så kan en vis sorption til udstyret (plast) i de eksperimentelle opstillinger være en del af forklaringen, ihvertfald for de lidt mere hydrophobe pesticider (propiconazol og pirimicarb). Den lange opholdstid (14 dage) i reservoir-dunkene antager vi ikke har betydet væsentlig omsætning, idet forholdene der må sidestilles med laboratoriebetingelser, hvor DT_{50} for de tre stoffer er 45-90 dage.

Den konsekvent lavere udløbskoncentration i forhold til indløbskoncentration fra samme måleperiode kunne skyldes sorption til mineralske og/eller organiske sorbenter i de anvendte naturlige sediment. Derudover kan den relativt lange opholdstid i kamrene (5 - 8 dage) også have medført en vis omsætning, særligt hvad angår bentazon og pirimicarb, idet de begge er non-persistente under feltbetingelser (hvilket vores kamre med sediment må formodes at repræsentere), med DT_{50} værdier på henholdsvis 14 og 9 dage (men dog ved 20 °C). Desuden nedbrydes begge disse stoffer ret hurtigt fotokemisk, og kamrene var udsat for ret kraftigt lys. Disse over vejelser er slet ikke relevante for propiconazol, der er meget mere stabilt.

Det er dog vigtigt at slå fast, at der var pesticider i udløbsvandet, og selvom koncentrationerne i eksperimenterne ofte var lavere end tilsigtet, så mener vi ikke det er afgørende for projektets overordnede resultater og konklusioner. Hvorvidt de ”høje” behandlingskoncentrationer har været fx 1 eller 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ er formentlig ikke så afgørende, idet selv 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ vil være en relativ høj koncentration i grundvand, og kun ganske få effekter blev påvist.

Der blev ikke i noget tilfælde konstateret krydskontaminering (et pesticid i en kombination hvor det ikke burde være). I en del tilfælde blev der dog målt pesticider i stikprøverne af både indløbs- og udløbsvand fra kontrolkamre. Dette er selvsagt temmelig uheldigt og ikke særlig hensigtsmæssig for tolkningen af resultaterne. Vi kan ikke afgøre om det skyldes en procedurefejl i forbindelse med prøveudtagning og analyse, eller om der reelt er tale om, at mikrokosmos var udsat for utilsigtede kontamineringer. Noget der taler for at, i hvert fald nogle af tilfældene, drejer sig om procedurefejl ved udtagning/analyse af prøver er, at der ikke er sammenfald i kammer nummer mellem kontaminering i ind- og udløbsvand i de tilfælde hvor begge blev udtaget. Hvorom alting er, så kan dette naturligvis have påvirket detektion af eventuelle forskelle i effekter mellem kontroller og de lave koncentrationer, men næppe analysen af effekten af de høje koncentrationer. Og da selv ikke de høje koncentrationer medførte klare effekter vurderer vi at disse ”kontamineringer” ikke har påvirket vores overordnede konklusioner af projektet.

Et andet aspekt er pesticidernes biologiske tilgængelighed. Selvom de tre anvendte stoffer er moderat til meget letopløselige, så kan vi ikke afvise at noget har været bundet til suspenderede organiske partikler som fx alger, bakterier og detritus. Idet vandprøverne ikke blev filtreret inden analyse af pesticider, er den bundne fraktion inkluderet i de angivne koncentrationer, selvom den muligvis ikke har været fuldt biotilgængelig. Vi har ikke mulighed for at vurdere betydningen af dette forhold.

Den store variabilitet i de fleste responsparametre og det relativt lave antal replikater af hver behandling i del 1 og 2 ($n = 3$) gjorde det vanskeligt at detektere blandings effekter af pesticider. Antallet af replikater blev dog hævet i den efterfølgende del 3 ($n = 10$) og del 4 ($n = 6$), men også i disse eksperimenter fandtes få effekter af kombinationer. I alle eksperimenter var antallet af replikater højt for kontroller og enkeltstoffer, men igen uden konsistente resultater. Der er således ikke grundlag for at forklare de manglende og/eller sporadiske resultater med lav statistisk følsomhed.

Omvendt fandt vi enkelte resultater, der ikke umiddelbart er logiske (fx positiv effekt af fungicid og insekticid på nedbrydning af blade i del 2, og negativ effekt af insekticid på rodudvikling hos tvepibet lobelie i del 3). På samme måde var der få signifikante resultater, der var inkonsistente med øvrige resultater; som fx effekten af de 15 pesticidbehandlinger på sedimentets koncentration af ammonium og DIC i del 1, der ikke kunne forklares ud fra en effekt på fotosyntese og respiration eller rodudvikling hos planterne, og iøvrigt ikke optrådte i del 2. I del 3 fandt vi en stimulerende effekt af bentazon ved lav koncentration på bladantallet hos strandbo, mens der ikke blev fundet tegn på dette hverken i del 1 eller del 4, hvor strandbo også indgik. Ligeledes var det sådan i del 2, at skudvægten hos vandmynte stimuleredes af lav koncentration af propiconazol og hæmmedes ved høj koncentration, men disse resultater kunne ikke genfindes, hverken i del 3 eller del 4. Vi kan ikke udelukke at sådanne resultater skyldes at tilfældige variationer optræder som signifikante i 5 procent af tilfældene (type 1 fejl).

5. Konklusion

Dette projekts formål var at undersøge mulige effekter af konstant langtidseksponering til pesticider på arter og processer tilknyttet bunden i ferskvand. Dette kan tænkes at finde sted i kildevandsbaserede systemer i et scenarium med kontaminering af det øvre grundvand.

Projektet undersøgte effekter af lave ”miljørealistiske” ($0,05 \mu\text{g L}^{-1}$) såvel som høje ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) koncentrationer af herbicidet bentazon, fungicidet propiconazol og insekticidet pirimicarb, både hver for sig, og som blandinger. Den eksperimentelle tilgang var ”naturlignende” mikrokosmos-opstillinger, der forløb over 4 – 6 måneder, udført i laboratoriet. Eksperimenterne inkluderede alger, svampe, smådyr samt flere arter af vandplanter med varierende vækststrategier. Der blev målt på adskillige fysiologiske og økologiske responsparametre på både organisme- og systemniveau.

Eksperimenterne gav ikke anledning til konsistente målebare ændringer hos de undersøgte arter, samfund og processer. Projektets formål må i det store og hele anses for værende opfyldt, idet vi på baggrund af vores på forhånd opstillede hypoteser kan konkludere at:

- Grundskudsplanter med langsom vækst, fra næringsfattige søer, blev *ikke* kraftigere påvirkede i deres fysiologi, vækst og overlevelse af pesticider end amfibiske planter/vandskudsplanter med hurtig vækst.
- Herbicider, fungicider og insekticider i kombination og efter lange påvirkningstider udløste *ikke* et særligt stress på nogle af de undersøgte organismer eller processer, og vi kunne således ikke påvise ”cocktail-effekter”.
- Langsomtvoksende rundskudsplanter som er afhængig af veludviklet svampemykorrhiza var *ikke* særligt følsomme for nogen af de tre anvendte pesticidgrupper.
- Pesticider påvirkede *ikke* den samlede omsætning i sedimentet, og fremkaldte *ikke* dårligere forhold for grundskudsplanternes rødder ved forøget iltvind og ophobning af fytotoxiner (fx ferrojern, ammonium).
- Pesticider påvirkede effekten af næringssaltberigelse på væksten af fastsidende mikroalger, men interagerede *ikke* med næringssalte ved at påvirke ”resultatet” af konkurrenceforholdet mellem langsomt voksende grundskudsplanter og hurtigt voksende vandskuds- og amfibiske planter.
- Nedbrydning af groft detritus samt opbygning af algebiomasse påvirkedes *ikke* af pesticider, hverken direkte eller indirekte via effekt på ituvivere og græssere blandt smådyrene.

6. Perspektivering

6.1 Forskning

Der er fundamentalt set tre forskellige måder, hvorpå eventuelle effekter af pesticider på bundlevende ferskvandssamfund kan undersøges: 1) deskriptive feltundersøgelser af sammenhænge mellem koncentrationer af pesticider og udvalgte samfundsparametre ved inddragelser af mange lokaliteter, der dækker en bred gradient i pesticidpåvirkning, 2) eksperimentelle studier, hvor pesticidpåvirkningen manipuleres i felten, og 3) eksperimentelle studier, hvor pesticidpåvirkningen manipuleres i laboratoriet.

Deskriptive feltscreeninger af sammenhænge mellem pesticider og samfundsparametre giver potentielt den bedste dokumentation for om der reelt eksisterer sammenhænge, men kræver at der tilvejebringes tilstrækkelig brede gradienter i påvirkning. Ulempen er, at mekanismen bag eventuelle sammenhænge ikke vil kunne fastlægges. For så vidt angår eksperimenter i felten, så er det logistisk særdeles udfordrende at udføre sådanne over længere tid. Risikoen for at noget ”går galt” er altid høj. Desuden er der snævre grænser for hvilke typer af pesticidbehandlinger, der kan tillades under naturlige forhold i felten.

I modsætning hertil har laboratorieeksperimenter den fordel, at forsøgsbetingelserne, i hvert fald i teorien, er lettere at styre, hvilket reducerer utilsigtet variation i andre parametre. Det er derfor generelt lettere at påvise effekter i kontrollerede laboratorieeksperimenter end i felten. Omvendt er der også en fare for at påvise effekter under laboratorieforhold, der reelt ingen betydning har i den ”virkelige natur”. Det kan være enten fordi effekterne ikke er til stede i felten, eller fordi de ikke kan påvises, eventuelt fordi de overskygges af andre mere betydende faktorer, eller fordi den naturlige variation er for stor. Eksempelvis er næringsstofeffekter på alger og planter så store, at de let overskygger eventuelle pesticideffekter.

Her er det at mikro/mesokosmosopstillinger har deres styrke, nemlig ved at kombinere de kontrollerede forsøgsbetingelser, med en højere grad af naturlig kompleksitet og variation. De er således den bedste mulighed for at vurdere effekten af miljøfremmede stoffer i komplekse økosystemer på et højt organisationsniveau (Boyle & Fairchild 1997). Ved at inkludere flere arter på samme tid, er der også større chance for at detektere indirekte effekter forårsaget af biologiske interaktioner, dvs. samspil mellem arter (Taub 1997). Mikro/mesokosmosopstillinger er også anvendt i undersøgelser af pesticideffekter, og en del har vist påvirkninger af alger og makroinvertebrater, men ikke alle af disse studier vurderes til at være af ”god kvalitet” (Møhlenberg et al. 2001). Kun ganske få har forløbet over lang tid (Vervliet-Scheebaum et al. 2010). Ofte har formålet været at teste om langtidseksponering til fx en faktor 0,1 (”safety factor”) af kendte $L(E)C_{50}$ koncentrationer af udvalgte pesticider er en rimelig grænse med henblik på at sikre mod langtidseffekter på organismer og økosystemprocesser, og typisk har denne ”safety factor” været tilstrækkelig til at forhindre sådanne (fx. Leeuwangh et al. 1994; Cuppen et al. 2000; Van den Brink

2009). Dog har mikro/mesokosmosstudier den svaghed (ligesom det er tilfældet for enhver anden eksperimentel tilgang), at de opnåede resultater til en vis grad afhænger af den konkrete opstilling (Boyle & Fairchild 1997). Derfor er det vigtigt at understrege, at selv de bedste mikro/mesokosmossystemer formentlig aldrig på fuldt tilstrækkelig vis vil være i stand til at afspejle de reelle og meget komplekse forhold i et naturligt miljø. Ekstrapolering af resultater fra disse eksperimenter til naturlige miljøer skal derfor tages med forbehold. Imidlertid mener vi, at de er anvendelige i vurdering af pesticidskader af økologisk relevans.

I naturen forekommer typisk flere end tre pesticider på samme tid. Vores studium afdækker ikke den mulige cocktaileffekt af mange stoffer, der måtte forekomme på samme tid. Vi finder det relevant at teste for sådanne mulige effekter, men vil gøre opmærksom på, at tolkningen af eventuelle resultater, hvor der forekommer effekter, bliver vanskelige, fordi de specifikke virkningsmåder ikke er kendte. Man vil eksempelvis kunne konkludere, at signifikante negative effekter optræder og vurdere alvoren af disse, men man kan i sagens natur ikke vide, om det er ét, nogle få, eller de mange stoffer sammen, som fremkalder resultatet.

Selvom dette projekt forsøgte at afdække effekter af ”kronisk” eksponering til pesticider, og selv med eksperimentelle forløb på 4-6 måneder ikke formåede at vise tydelige effekter, så kan vi ikke afvise påvirkning af responsparametre, som vi ikke har målt, men som dog alligevel kan medføre langsigtede effekter. Hvis fx makrofytternes formeringsegenskaber som blomstersætning, frøproduktion og/eller sætning af turioner (”hvileknopper”) og udløbere i forbindelse med ukønnet formering påvirkes, så kan det medføre nedsat spredning og etablering på en helt anden tidsskale end vi har undersøgt. Disse reaktioner er kendt i forbindelse med stressende forhold hos planter. Det samme gør sig gældende for vækst og formering af smådyrene, hvor sådanne effekter er beskrevet (Schulz & Liess 2001; Cold & Forbes 2004; Wiberg-Larsen & Nørum 2009; Wiberg-Larsen *et al.* 2012). Sådanne mere ”subtile” langtidseffekter kan være vanskelige at påvise eksperimentelt, men kan ikke desto mindre være økologisk særdeles væsentlige, og vi kan derfor kun anspore til mere forskning på dette område. Generelt peger vi på at opfølgende undersøgelser, både eksperimentelle og feltscreeninger, vil være nødvendige for at øge vores viden om den potentielle effekt af kronisk eksponering med pesticider.

6.2 Miljøforvaltning

I dette projekt arbejdede vi med lave og konstante pesticidkoncentrationer, som med den øjeblikkelige viden og behandlingsintensitet, anses for miljørealistiske i grundvand og overfladevand. Vi fandt ganske få og små effekter af de tre undersøgte pesticider, hver for sig, såvel som sammen. Denne konklusion kan selvfølgelig ikke udstrækkes til højere koncentrationer, eller til situationer hvor stofferne optræder i andre sammenhænge end dem, vi her har belyst, fx sammen med andre stoffer.

I naturen bliver organismer og økosystemer dog primært udsat for kortvarige pulse af til tider temmeligt høje koncentrationer af pesticider i overfladeafstrømning forårsaget af fx regneepisoder og/eller vinddrift. Naturlige samfund, der allerede er stressede af kronisk eksponering til relativt lave koncentrationer (uden at denne stresstilstand nødvendigvis kan påvises), kan tænkes at

reagere kraftigere end ellers overfor pulseksponeringer. Med andre ord, effekten af kronisk påvirkning og pulseksponering er ikke nødvendigvis additiv.

Det er dyrt at registrere og måle pulse af pesticider i overfladevand, og datagrundlaget er særdeles sparsomt. Af de tre pesticider undersøgt i dette projekt ingår fx kun bentazon i Novana overvågningsprogrammet, mens ingen fungicider overhovedet bliver analyseret for (Naturstyrelsen 2011). Vi ved således meget lidt om dels varigheden og koncentrationer af pulse i overfladevand, dels i hvilken type grundvandsdominerede eller ikke grundvandsdominerede miljøer og i hvilke koncentrationer pesticider forekommer mere konstant. Det gør det svært at vurdere sagens potentielle økologiske betydning, og vi kan opfordre til en opgradering af overvågning af pesticider i miljøet, sammenholdt med overvågningen af de naturlige samfund.

Men vi finder altså, på dette konkrete grundlag, ikke anledning til at nære bekymringer for skadelige effekter af langvaring ("kronisk") eksponering til disse tre stoffer på de undersøgte arter og økosystemer, sådan som det kan tænkes at finde sted i samfund der er betinget af grundvandstilstrømning

Referencer

- Allan JD & Castillo MM. 2007. Stream Ecology. Springer.
- Andersen FØ & Andersen T. 2006. Effects of arbuscular mycorrhiza on biomass and nutrients in the aquatic plant, *Littorella uniflora* subject to organic enrichment. Freshwater Biology 50: 1034-1048.
- Andersen TH, Tjørnhøj R, Wollenberger L, Slothuus T & Baun A. 2006. Acute and chronic effects of pulse exposure of *Daphnia magna* to dimethoate and pirimicarb. Environmental Toxicology and Chemistry 25: 1187-1195.
- Arts GHP, Belgers JDM, Hoekzema CH & Thissen JTNM. 2008. Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests. Environmental Pollution 153: 199-206.
- Beck-Nielsen D & Madsen TV. 2001. Occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhiza in aquatic macrophytes from lakes and streams Aquatic Botany 71: 141-148.
- Belgers JDM, Aalderink GH, Arts GHP & Brock TCM. 2011. Can time-weighted average concentrations be used to assess the risks of metsulfuron-methyl to *Myriophyllum spicatum* under different time-variable exposure regimes? Chemosphere 85: 1017-1025.
- Belgers JDM, Van Lieverloo RJ, Van der Pas LJT & Van den Brink PJ. 2007. Effects of the herbicide 2,4-D on the growth of nine aquatic macrophytes. Aquatic Botany 86: 260-268.
- Boyle TP & Fairchild JF. 1997. The role of mesocosm studies in ecological risk analysis. Ecological applications 7: 1099-1102.
- Brüsch W, Rosenbom AE, Juhler RK, Gudmundsson L, Nielsen CB, Plauborg F & Olsen P. 2013. The Danish Pesticide Leaching Assessment Programme. Monitoring results 1999-June 2012. Geological Survey of Denmark and Greenland.
- Calonne M, Fontaine J, Debiane D, Laruelle F, Grandmougin-Ferjani A & Lounès-Hadj Sahraoui A. 2010. Propiconazole toxicity on the non-target organism, the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus irregular*. I: Carisse O (Ed.), Fungicides, InTech, Rijeka. pp. 325-346.
- Cedergreen N. 2008. Herbicides can stimulate plant growth. Weed Research 48: 429-438.
- Cedergreen N & Streibig JC. 2005. The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: assessment of predictive factors and hazard Pest Management Science 61: 1152-1160.
- Cedergreen N, Streibig JC, Kudsk P, Mathiassen SK & Duke SO. 2007. The occurrence of hormesis in plants and algae. Dose-Response 5: 150-162.
- Cedergreen N, Streibig JC & Spliid NH. 2004. Pesticiders påvirkning af planter og alger i vandmiljøet. Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen nr. 89.
- Cold A & Forbes V. 2004. Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex*. Aquatic Toxicology 67: 287-299.
- Coutris C, Merlina G, Silvestre J, Pinelli E & Elger A. 2011. Can we predict community-wide effects of herbicides from toxicity tests on macrophyte species? Aquatic Toxicology 101: 49-56.
- Cuppen JGM, Van den Brink PJ, Camps E, Uil KF, Brock TCM. 2000. Impact of the fungicide carbendazim in freshwater microcosms. I. Water quality, breakdown of particulate organic matter and responses of macroinvertebrates. Aquatic Toxicology 48: 233-250

- Debenest T, Pinelli E, Coste M, Silvestre J, Mazzella N, Madigou C & Delmas F. 2009. Sensitivity of freshwater periphytic diatoms to agricultural herbicides. *Aquatic Toxicology* 93: 11–17
- Dosnon-Olette R, Couderchet M & Eullaffroy P. 2009. Phytoremediation of fungicides by aquatic macrophytes: Toxicity and removal rate. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 2096–2101.
- Efsa (European Food Safety Authority) 2014. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance tebuconazole1 EFSA Journal 12(1): 3485
- Ejrnæs R, Baattrup-Pedersen A, Riis T, Lauge Pedersen M, Hoffmann CC, Kronvang B & Johansen OM. 2014. Herbicider i terrestriske vådområder - Herbiciders forekomst, mængde, spredningsveje og effekter i moser i udvalgte jyske ådale. Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen nr. 154.
- Feminella JW & Hawkins CP. 1995. Interactions between Stream Herbivores and Periphyton: A Quantitative Analysis of past Experiments. *Journal of the North American Benthological Society* 14: 465-509.
- Forney DR & Davis DE. 1981. Effects of low concentrations of herbicides on submerged aquatic plants. *Weed Science* 29: 677-685.
- Gessner MO & Chauvet E. 1994. Importance of stream microfungi in controlling breakdown rates of leaf litter. *Ecology* 75: 1807–1817.
- Geus 2009. Grundvandsovervågning 2008. Status og udvikling 1989 – 2007. GEUS.
- Graça MAS & Canhoto C. 2006. Leaf litter processing in low order streams. *Limnetica* 25: 1-10
- Gustavson K, Møhlenberg F & Schlüter L. 2003. Effects of Exposure Duration of Herbicides on Natural Stream Periphyton Communities and Recovery. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45: 48–58.
- Huiyun PAN, Xiaolu LI, Xiaohua XU & Shixiang GAO. 2009. Phytotoxicity of four herbicides on *Ceratophyllum demersum*, *Vallisneria natans* and *Elodea nuttallii*. *Journal of Environmental Sciences* 21: 307–312.
- Jensen PN, Boutrup S, Svendsen LM, Blicher-Mathiesen G, Wiberg-Larsen P, Bjerring R, Hansen JW, Ellermann T, Thorling L & Holm AG. 2013. Vandmiljø og Natur 2012. NOVANA. Tilstand og udvikling - faglig sammenfatning. Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi, 86 s. - Videnskabelig rapport fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 78
- Kjøller R & Rosendahl S. 2000. Effects of fungicides on arbuscular mycorrhizal fungi: differential responses in alkaline phosphatase activity of external and internal hyphae. *Biol Fertil Soils* 31: 361-365.
- Kling M & Jakobsen I. 1997. Direct application of carbendazim and propiconazole at field rates to the external mycelium of three arbuscular mycorrhizal fungi species: effect on ³²P transport and succinate dehydrogenase activity. *Mycorrhiza* 7: 33-37.
- Kosinski RJ. 1984. The effect of terrestrial herbicides on the community structure of stream periphyton. *Environmental Pollution Series A* 36: 165–189
- Kronvang B, Strøm HL, Hoffman CC, Laubel A & Friberg N. 2004. Subsurface tile drainage loss of modern pesticides: field experiment results. *Water Science and Technology* 49: 139-148.
- Lauridsen RB, Kronvang B & Friberg N. 2006. Occurrence of sediment-bound pyrethroids in Danish streams and their impact on ecosystem function. *Water, Air and Soil Pollution* 6: 423-432.

- Leeuwangh P, Brock TCM & Kersting K. 1994. An evaluation of four types of freshwater model ecosystem for assessing the hazard of pesticides. *Human & Experimental Toxicology* 13: 888-899.
- Liess M & Von der Ohe PC. 2005. Analyzing effects of pesticides on invertebrate communities in streams *Environmental Toxicology & Chemistry* 24: 954-965.
- Macedo RS, Lombardi AT, Omachi CY & Rörlig LR. 2008. Effects of the herbicide bentazon on growth and photosystem II maximum quantum yield of the marine diatom *Skeletonema costatum* *Toxicology in Vitro*, 22 716–722.
- Miljøstyrelsen 2013. Bentazon. Anvendelse, regulering og fund i danske monitoringsundersøgelser. Orientering fra Miljøstyrelsen 1.
- Muirhead-Thomson RC. 1987. Pesticide impact on stream fauna with special reference to macroinvertebrates. Cambridge University Press.
- Munkegaard M, Abbaspoor M & Cedergreen N. 2008. Organophosphorous insecticides as herbicide synergists on the green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and the aquatic plant *Lemna minor*. *Ecotoxicology* 17: 29–35.
- Møhlenberg F, Petersen S, Gustavson K, Lauridsen T, Friberg N. 2001. Mesocosm experiments in the approval procedure for pesticides – a literature study on effects of mesocosm characteristic and validity of extrapolation methods to protect sensitive species. *Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen* nr. 56.
- Møhlenberg F, Kaas H, Schlüter L, Gustavson K, Andersen TT, Forbes V, Cold A, Friberg N, Larsen SE & Lauridsen RB. 2004. Effekter af bekæmpelsesmidler på flora og fauna i vandløb. *Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen* nr. 82.
- Møller CL & Sand-Jensen K. 2008. Iron plaques improve the oxygen supply to root meristems of the freshwater plant, *Lobelia dortmanna*. *New Phytologist* 179: 848-855.
- Møller CL & Sand-Jensen K. 2012. Rapid oxygen exchange across the leaves of *Littorella uniflora* provides tolerance to sediment anoxia. *Freshwater Biology* 57: 1875-1883.
- Møller CL & Sand-Jensen K. 2013. Organic enrichment of sediments reduces arbuscular mycorrhizal fungi in oligotrophic lake plants. *Freshwater Biology* 58: 769-779.
- Naturstyrelsen 2011. Det Nationale Overvågningsprogram for Vand og Natur. NOVANA 2011-2015. Programbeskrivelse.
- Nielsen LW & Dahllöf I. 2007. Direct and indirect effects of the herbicides Glyphosate, Bentazone and MCPA on eelgrass (*Zostera marina*) *Aquatic Toxicology*: 47–54.
- Nørgaard KB & Cedergreen N. 2009. Pesticide cocktails can interact synergistically on aquatic crustaceans. *Environmental Science and Pollution Research*. DOI: 10.1007/s11356-009-0284-4.
- Nørum U & Bjerregaard P. 2003. Ferskvandsinvertebraters bevægelsesadfærd som biomarkør for pesticideeksponering og –effekt. *Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen* nr. 75.
- Pulido C & Borum J. 2006. Eelgrass (*Zostera marina*) tolerance to anoxia. *Journal of experimental Biology and Ecology* 1-2: 8-13.
- Ramsay A & Fry JC. 1976. Response of aquatic bacteria to the treatment of two aquatic macrophytes with the herbicide paraquat. *Water Research* 5: 453-459.
- Rasmussen H. 2002. Recent development in orchid mycorrhiza. *Plant and Soil* 244: 149-163.

- Rasmussen JJ, Friberg N & Larsen SE. 2008. Impact of lambda-cyhalotrin on a macroinvertebrate assemblage in outdoor experimental channels: Implications for ecosystem functioning. *Aquatic toxicology* 90: 228-234.
- Rasmussen JJ, Monberg RJ, Baattrup-Pedersen A, Cedergreen N, Wiberg-Larsen P, Strobel B & Kronvang B. 2012a. Effects of a triazole fungicide and a pyrethroid insecticide on the decomposition of leaves in the presence or absence of macroinvertebrate shredders. *Aquatic Toxicology* 118 – 119: 54 – 61.
- Rasmussen JJ, Strobel BW, Kronvang B, Nørum U & Hansen HCB. 2014. Fra mark til vandløb – skæbne og skadevirkninger af insekticider i overfladevand. *Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen, i trykken.*
- Rasmussen JJ, Wiberg-Larsen P, Baattrup-Pedersen A, Juul Monberg R & Kronvang B. 2012b. Impacts of pesticides and natural stressors on leaf litter decomposition in agricultural streams *Science of the total environment* 416: 148-155.
- Relyea RA. 2009. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia* 159: 363–376.
- Rogers KH & Breen CM. 1982. Effects of epiphyton on *Potamogeton crispus* leaves. *Microbial Ecology* 7: 353-363.
- Sand-Jensen K & Borum J. 1991. Interactions among phytoplankton, periphyton, and macrophytes in temperate fresh-waters and estuaries. *Aquatic Botany* 41: 137-175.
- Sand-Jensen K, Borum J & Binzer T. 2005. Oxygen stress and reduced growth of *Lobelia dortmanna* in sandy lake sediments subjected to organic enrichment. *Freshwater Biology* 50: 1034-1048.
- Sand-Jensen K & Jacobsen D. 2002. Herbivory and growth in terrestrial and aquatic populations of amphibious plants. *Freshwater Biology* 47: 1475-1487.
- Schou-Frandsen M. 2009. Growth response of underwater vegetation to groundwater seepage in freshwater lakes. Masters thesis. Freshwater Biological Laboratory, University of Copenhagen.
- Schulz R & Liess M. 2001. Toxicity of aqueous-phase and suspended particle-associated fenvalerate: Chronic effects after pulse-dosed exposure of *Limnephilus lunatus* (Trichoptera). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 185-190.
- Stebbing ARD. 1982. Hormesis - The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Science of the total environment* 22: 213-234.
- Styczen M, Wiberg-Larsen P & Aagaard A. 2003. Tag pulsen på pesticiderne i vandmiljøet. *Vand & Jord* 10: 84-87.
- Taub FB. 1997. Unique Information Contributed by Multispecies Systems: Examples from the Standardized Aquatic Microcosm. *Ecological Applications* 7: 1103-1110.
- Thorling L, Brüsch W, Hansen B, Larsen CL, Mielby S, Trolborg L & Sørensen BL. 2013. Grundvand, Status og udvikling 1989 – 2012. GEUS 2013.
- Van den Brink PJ, Crum SJH, Gylstra R, Bransen F, Cuppen JGM, Brock TCM. 2009. Effects of a herbicide-insecticide mixture in freshwater microcosms: Risk assessment and ecological effect chain *Environmental Pollution* 157: 237–249.
- Verbruggen EMJ & Van den Brink PJ. 2010. Review of recent literature concerning mixture toxicity of pesticides to aquatic organisms RIVM Report 601400001/2010. Alterra & Wageningen University.

- Vervliet-Scheebaum M, Straus A, Tremp H, Hamer M, Maund SJ, Wagner E & Schulz R. 2010. A microcosm system to evaluate the toxicity of the triazine herbicide simazine on aquatic macrophytes. *Environmental Pollution* 158: 615–623.
- Vinebrooke RD, Schindler DW, Findlay DL, Turner MA, Paterson M & Mills KH. 2003. Trophic dependence of ecosystem resistance and species compensation in experimentally acidified Lake 302S (Canada). *Ecosystems* 6: 101-113.
- Wallace JB & Webster JR. 1996. The role of macroinvertebrates in stream ecosystem function. *Annual Review of Entomology* 41: 115-139.
- Wiberg-Larsen P & Nørum U. 2009. Effekter af pyrethroidet lambda-cyhalothrin på biologisk struktur, funktion og rekolonisering i vandløb. *Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen* nr. 126.
- Wiberg-Larsen P, Nørum U & Friberg N. 2012. Betydningen af gentagne pulse af lambda-cyhalothrin for makroinvertebratfaunaen i vandløb. *Bekæmpelsesmiddelforskning fra Miljøstyrelsen* nr. 145

Resumé

Formålet med forskningsprojektet var at opnå viden om fysiologiske og økologiske effekter på planter, alger, mykorrhizasvampe, smådyr og stofomsætning i bundsamfund i ferskvande udsat for langvarig eksponering til pesticider, som det kan tænkes at finde sted i kildevandsbaserede systemer i et scenarium med kontaminering af det øvre grundvand.

Projektet bestod af fire eksperimentelle mikrokosmosstudier udført i laboratorium. Langtidseffekten af forskellige kombinationer af herbicidet bentazon, fungicidet propiconazol og insekticidet pirimicarb i "grundvandsrealistiske" ($0,05 \mu\text{g L}^{-1}$) såvel som høje ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) koncentrationer undersøgte på en lang række økologiske processer og fysiologiske parametre hos fire forskellige udvalgte plantesamfund: langsomt voksende grundskudsplanter i naturlige, uforstyrrede sedimentkerner og smådyr fra næringsfattige søer (delprojekt 1), samplantede amfibiske planter (vandmynte, tykbladet ærenpris og vandstjerne) fra vandløb (delprojekt 2), en kombination af ovennævnte plantegrupper uden sediment (delprojekt 3) og en kombination af samplantede grundskuds-, vandskuds- og amfibiske planter ved forskellig næringstilførsel og med og uden pesticideksponering (delprojekt 4).

Der blev fundet en betydelig variation i flere af de målte parametre. Det gør det generelt vanskeligt at vurdere kombinationseffekter af de tre undersøgte stoffer, men vores resultater viser samstemmende, at



Miljøministeriet
Miljøstyrelsen

Strandgade 29
1401 København K
Tlf.: (+45) 72 54 40 00

www.mst.dk